

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ADRIANO DE SOUZA SILVA

PLATAFORMA NANOESTRUTURADA BASEADA EM POLÍMERO CONDUTOR E
NANOPARTÍCULAS METÁLICAS NO DESENVOLVIMENTO DE UM
IMUNOSSENSOR PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

CURITIBA

2025

ADRIANO DE SOUZA SILVA

PLATAFORMA NANOESTRUTURADA BASEADA EM POLÍMERO CONDUTOR E
NANOPARTÍCULAS METÁLICAS NO DESENVOLVIMENTO DE UM
IMUNOSSENSOR PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Química, do Setor de Ciências Exatas, da
Universidade Federal do Paraná, como requisito
parcial à obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Dênio E. P. Souto

CURITIBA

2025

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Silva, Adriano de Souza

Plataforma nanoestruturada baseada em polímero condutor e nanopartículas metálicas no desenvolvimento de um imunossensor para leishmaniose visceral canina / Adriano de Souza Silva. – Curitiba, 2025.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química.

Orientador: Dênio Emanuel Pires Souto

1. Doenças tropicais. 2. Leishmaniose visceral. 3. Proteína recombinante K39. 4. Proteína recombinante C1. I. Universidade Federal do Paraná. II. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Souto, Dênio Emanuel Pires. IV. Título.

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ADRIANO DE SOUZA SILVA**, intitulada: **Plataforma nanoestruturada baseada em polímero condutor e nanopartículas metálicas no desenvolvimento de um imunossensor para leishmaniose visceral canina**, sob orientação do Prof. Dr. DÊNIO EMANUEL PIRES SOUTO, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 28 de Abril de 2025.

Assinatura Eletrônica

14/05/2025 11:18:58.0

DÊNIO EMANUEL PIRES SOUTO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

14/05/2025 11:21:42.0

FREDERICO LUIS FELIPE SOARES

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

15/05/2025 14:32:06.0

CLARICE DIAS BRITTO DO AMARAL

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

30/05/2025 09:31:41.0

VICTOR HUGO RODRIGUES DE SOUZA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS)

Assinatura Eletrônica

14/05/2025 14:05:44.0

LUIS FERNANDO QUINTINO PEREIRA MARCHESI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ)

Dedico este trabalho à minha mãe,
dona Maria José

AGRACEDIMENTOS

À minha mãe, meu padrasto e minhas irmãs Juliana, Denize e Marina, que sempre acreditaram em mim e que, com muito carinho e apoio, nunca mediram esforços para me ajudar quando sai de Manaus à Curitiba para fazer doutorado. Obrigado por compreenderem que eu não ia ser tão presente em determinadas datas e momentos especiais devido à distância e disponibilidade financeira.

Ao meu orientador, prof. Dr. Dênio Emanuel Pires Souto, por ter aceitado me orientar e compreender todas minhas dificuldades acadêmicas, pessoais e pelo voto de confiança. Obrigado também por me fazer gostar de doenças tropicais negligenciadas.

Aos meus amigos de longa data desde o curso de Física: Ítalo, Katrine, Thalisson e Joelma, obrigado pelos momentos de descontração quando, à época, dividíamos bancada no Laboratório de Polímeros Nanoestruturados e que, apesar de termos trilhados destinos diferentes, o carinho se manteve presente.

Aos colegas de laboratório que fiz ao ingressar no Laboratório de Espectrometria, Sensores e Biossensores, Jaqueline, Luana, Floriatan e Letícia. Obrigado por compartilharem momentos, dificuldades e, mais especialmente, a Jaqueline por ser uma pessoa sensacional, solidária e por tanto me ajudar nos experimentos e nas discussões em eletroquímica.

Agradeço ao prof. Dr. Márcio Vidotti, meu primeiro contato no programa de pós-graduação em Química quando decidi sair do doutorado em Física e ir trabalhar com o que eu queria de fato: biossensores. Obrigado pela hospitalidade e por me apresentar a eletroquímica. Ainda, agradeço ao Grupo de Pesquisa em Macromoléculas e Interfaces, especificamente ao Andrey, Tatiana e Bruna, pelo suporte no início do curso.

Ao meu cachorro, Bentinho, que sempre ficou à minha espera e que me recebe até hoje com uma explosão de alegria, pulos e lambeijos.

Agradeço ao Morgano, que me fez apaixonar pelo m(a)r.

A todos aqueles que estiveram próximos, fazendo a convivência mais leve e descontraída. Ainda, agradeço ao CNPq e a CAPES pelo suporte financeiro através das bolsas de estudo concedidas, o que foi essencial para realização deste trabalho.

RESUMO

A leishmaniose, uma doença tropical parasitária negligenciada, está distribuída em mais de 90 países ao redor do mundo. A leishmaniose visceral, forma mais grave da doença, afeta mais de 80 países e apresenta estatísticas de incidência e mortalidade mais expressivas, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS). No entanto, apesar dos grandes esforços empreendidos pela Organização das Nações Unidas (ONU), com a instituição dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) – que criam metas para a erradicação da doença até 2030; o cenário ainda exige mais ações. Inclusive no que diz respeito ao diagnóstico, uma vez que os métodos tradicionais de identificação dessa parasitose, sejam eles moleculares ou de detecção de anticorpos específicos, apresentam limitações. Neste sentido, uma atenção elevada tem sido dada ao desenvolvimento de novas estratégias para a detecção da doença. No presente trabalho, foi desenvolvido um imunossensor do tipo impedimétrico para a detecção de anticorpos específicos para leishmaniose visceral canina. Isso foi feito a partir da modificação de uma plataforma de baixo custo, uma malha de aço, modificada com nanoestruturas baseadas no polímero condutor polipirrol dopado com poli(4-estirenosulfonato de sódio), decoradas com nanopartículas metálicas de ouro (PPy:PSS-AuNPs). Em seguida, sobre a plataforma desenvolvida, uma monocamada auto-organizada (SAM) foi formada pela adição do ácido 3-mercaptopropiônico (3-MPA), visando uma melhor orientação do elemento de reconhecimento biológico. Duas proteínas recombinantes provenientes do protozoário *Leishmania infantum* (agente etiológico da leishmaniose visceral) – uma com função bem estabelecida (proteína K39) e outra com função ainda desconhecida (proteína C1); foram ancoradas à plataforma desenvolvida e exploradas como biorreceptores para a detecção de anticorpos contra *L. infantum*. Ambos os imunossensores se mostraram promissores para o imunodiagnóstico da leishmaniose visceral. Através da plataforma proposta (PPy:PSS-AuNPs) foi possível obter limite de detecção (LOD) de $5,79 \text{ pmol L}^{-1}$ e um limite de quantificação (LOQ) de $19,32 \text{ pmol L}^{-1}$ para K39. Para o imunossensor construído com a C1, o LOD foi de $3,91 \text{ fmol L}^{-1}$ e LOQ de $13,05 \text{ fmol L}^{-1}$. Adicionalmente, os testes com as proteínas em amostras reais dos grupos positivo e negativo para a leishmaniose visceral canina apresentaram vantagens em comparação aos métodos de diagnósticos tradicionais, como maior sensibilidade, especificidade e menor tempo de resposta. Portanto, os resultados obtidos nesta pesquisa visam contribuir para melhorias no diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral e para a diminuição das estatísticas globais associadas a essa doença parasitária.

Palavras-chave: doenças tropicais negligenciadas, leishmaniose visceral, imunossensor impedimétrico, proteína recombinante K39, proteína recombinante C1.

ABSTRACT

Leishmaniasis, a neglected tropical parasitic disease, is distributed across more than 90 countries worldwide. Visceral leishmaniasis (VL), the most severe form of the disease, affects more than 80 countries and has the highest incidence and mortality rates, according to the World Health Organization (WHO). However, despite the considerable efforts made by the United Nations (UN) – through the establishment of the Sustainable Development Goals (SDGs) which aim to eradicate the disease by 2030; the situation still requires ongoing efforts, particularly in terms of diagnosis. Traditional methods for disease identification, whether molecular or for detecting specific antibodies, have limitations. In this regard, significant attention has been dedicated towards the development of new strategies for detecting this parasitic infection. In this work, an impedimetric immunosensor was developed for the detecting of specific antibodies against canine visceral leishmaniasis. This was achieved by modifying a low-cost platform – stainless steel mesh; which was functionalized with nanostructures based on the conducting polymer polypyrrole doped with poly(4-styrenesulfonic acid sodium salt) and decorated with gold metallic nanoparticles (PPy:PSS-AuNPs). Then, a self-organized monolayer (SAM) was formed on the developed platform by adding 3-mercaptopropionic acid (3-MPA), aiming for improved orientation of the biological recognition element. Two recombinant proteins from the protozoan *Leishmania infantum* (the etiological agent of visceral leishmaniasis) – one with a well-established function (protein K39) and another with an unknown function (protein C1) – were anchored to the developed platform and explored as bioreceptors for detecting antibodies against *L. infantum*. Both immunosensors proved promising for the immunodiagnostic of canine visceral leishmaniasis. Through the proposed platform (PPy:PSS-AuNPs), it was possible to obtain a limit of detection (LOD) of 5.79 pmol L^{-1} and quantification limit (LOQ) of $19.32 \text{ pmol L}^{-1}$ for rK39. For the immunosensor constructed with C1, the LOD was 3.91 fmol L^{-1} and LOQ was $13.05 \text{ fmol L}^{-1}$. Additionally, tests with the proteins in biological fluids both positive and negative groups for canine visceral leishmaniasis showed advantages over traditional diagnostic methods, such as higher sensitivity, specificity, and shorter response time. Therefore, the results obtained in this research aim to contribute to improvements in the serological diagnosis of visceral leishmaniasis and the reduction of global statistics associated with this parasitic disease.

Keywords: diseases tropical neglected, visceral leishmaniasis, impedimetric immunosensor, recombinant protein K39, recombinant protein C1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Doença, vetor causador, patógeno e via de transmissão de algumas das principais doenças tropicais negligenciadas.....	21
Figura 2 - Casos de leishmaniose visceral por região de infecção e ano.....	28
Figura 3 - (a) Casos e taxa de incidência de leishmaniose visceral por ano de notificação e coeficiente de incidência (por 100.000 habitantes) e (b) Óbitos e taxa de letalidade.....	29
Figura 4 - Métodos diagnósticos laboratoriais empregados para leishmaniose visceral.	30
Figura 5 - Tipos de exames realizados em 94 de 287 unidades de vigilância de zoonoses no Brasil: ano referência de 2022.	32
Figura 6 - Representação esquemática dos processos associados na tecnologia de DNA recombinante para síntese de proteínas.....	33
Figura 7 - Figura-conceito de um dispositivo biossensor.....	36
Figura 8 - Anos e números de publicações em biossensores eletroquímicos e biossensores eletroquímicos para serviços de saúde.	38
Figura 9 - Comportamento gráfico de uma perturbação aplicada, $V = V(t)$, e sua respectiva resposta, $i = i(t)$. As quantidades V_0 e i_0 representam a amplitude e φ o ângulo de defasagem.	40
Figura 10 - (A) Curva de Lissajous e (B) diagrama de Nyquist com vetor impedância.	41
Figura 11 - Elementos, parâmetros e impedância associadas para simulação de dados de EIS.	42
Figura 12 - Representação esquemática de um circuito de Randles simplificado....	44
Figura 13 - Formação da ligação σ e π no átomo de carbono.	46
Figura 14 - Nomes, fórmulas estruturais e valores de <i>gap</i> de alguns polímeros condutores.	47
Figura 15 - Diagrama esquemático para estrutura de bandas de uma quase-partícula do tipo pólaron: elétron e buraco.	49
Figura 16 - Diagrama esquemático da representação de uma quase-partícula do tipo: dois pólarons e bipólarons.	49
Figura 17 - Mecanismo de eletropolimerização do pirrol.	51
Figura 18 - Representação esquemática do (A) eletrodo de malha de aço e etapas de modificação a partir da eletrodeposição do (B) pirrol para formação do PPy:PSS e (C) incorporação de nanopartículas metálicas de ouro para obtenção do filme PPy:PSS-AuNPs. As nanoestruturas de ouro que compõem a figura na parte (C) não estão em escala e a disposição tem o intuito de apenas uma melhor compreensão visual da estratégia.	58
Figura 19 - Representação esquemática da estratégia utilizada para construção dos imunossensores impedimétricos baseados na plataforma nanoestruturada desenvolvida (PPy:PSS-AuNPs). As estruturas que compõem a figura não estão em escala e a disposição tem o intuito de apenas uma melhor compreensão visual da estratégia.	59
Figura 20 - Perfil eletroquímico para diferentes densidades de deposição de carga para caracterização da modificação dos eletrodos de malha de aço com PPy:PSS. (A) voltamogramas cíclicos e (B) diagramas de Nyquist.	63
Figura 21 - Comportamento eletroquímico para eletrodo modificado com PPy:PSS e PPy:PSS-AuNPs por (A) voltamogramas cíclicos e (B) digramas de Nyquist.	68

Figura 22 - Micrografias eletrônicas de varredura para: (A), (B), e (C) PPy:PSS; (D), (E) e (F) PPy:PSS-AuNPs, com destaque em círculo para aglomerado de nanopartículas metálicas de ouro incorporadas na matriz polimérica.	72
Figura 23 - Micrografias eletrônicas de transmissão para PPy:PSS-AuNPs com aumento de (A) 20.000 e (B) 30.000 vezes.	72
Figura 24 - Distribuição estimada do diâmetro das AuNPs observadas. Linha de ajuste: distribuição normal.	73
Figura 25 - Espectros de raios-x por energia dispersiva apresentando análise química elementar para uma fração da do eletrodo modificado com PPy:PSS-AuNPs.	74
Figura 26 - (A) comportamento voltamétrico cíclico e (B) diagramas de Nyquist para eletrodo modificado com filme de PPy:PSS-AuNPs e demais etapas de funcionalização para construção do imunossensor utilizando a proteína recombinante K39.	76
Figura 27 - (A) Diagramas de Nyquist obtidos para o imunossensor baseado na proteína recombinante K39 exposto a diferentes concentrações de anticorpo monoclonal mAb-K39 e (B) Curva analítica obtida a partir do ΔR_{ct} como função da concentração de mAb-K39.	77
Figura 28 - (A) Diagramas de Nyquist obtidos para imunossensor baseado na proteína recombinante C1 exposto a diferentes concentrações de anticorpo policlonal pAb-C1 e (B) Curva analítica obtida a partir do ΔR_{ct} como função da concentração de pAb-C1.	81
Figura 29 - Diagramas de Nyquist obtidos para imunossensor baseado em proteína recombinante K39 exposto a diferentes fatores de diluição em <i>pools</i> (A) negativo (n = 5) e (B) positivo (n = 5) para leishmaniose visceral canina.	83
Figura 30 - Diagramas de Nyquist obtidos para imunossensor baseado em proteína recombinante C1 exposto a diferentes fatores de diluição em <i>pools</i> (A) negativo (n = 5) e (B) (n = 5) positivo para leishmaniose visceral canina.	83
Figura 31 - Representação do perfil de diferenciação dos imunossensores baseados em (A) rK39 e (B) rC1 expostos aos <i>pools</i> de soros negativo e positivo para leishmaniose visceral canina para cada fator de diluição considerado.	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número absoluto de casos de leishmaniose visceral reportados. Data da última atualização: 20/11/2024.	25
Tabela 2 - Valores de parâmetros estimados a partir do ajuste de dados espectroscópicos de impedância eletroquímica para eletrodos modificados com PPy:PSS a diferentes densidades de carga.	66
Tabela 3 - Parâmetros eletroquímicos estimados para PPy:PSS e PPy:PSS-AuNPs.	70
Tabela 4 - Parâmetros eletroquímicos estimados a partir da modelagem dos espectros de impedância eletroquímica para cada etapa do imunossensor baseado na proteína recombinante K39.	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCPred	Método computacional utilizado para prever epítomos de células B em uma sequência antigênica (do inglês: <i>Artificial Neural Network Based B-cell Epitope Prediction Server</i>)
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida (do inglês: <i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>)
AuNPs	Nanopartículas metálicas de ouro (do inglês: <i>Gold Nanoparticles</i>)
BCPred	Método computacional utilizado para prever epítomos de células B (do inglês: <i>B-cell Epitope Prediction</i>)
COVID-19	Doença do coronavírus de 2019 (do inglês: <i>Conoravirus Disease 2019</i>)
CPE	Elemento de fase constante (do inglês: <i>Constant Phase Element</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DTNs	Doenças tropicais negligenciadas
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (do inglês: <i>Energy Dispersive X-ray Spectroscopy</i>)
EIS	Espectroscopia de impedância eletroquímica (do inglês: <i>Electrochemical Impedance Spectroscopy</i>)
ELISA	Teste sorológico imunoenzimático (do inglês: <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
EUA	Estados Unidos da América
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (do inglês: <i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
HOMO	Orbital de mais alta energia ocupado (do inglês: <i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>)
IFAT	Teste de imunofluorescência indireta (do inglês: <i>Immunofluorescent Antibody Test</i>)
IgG	Imunoglobulina G (do inglês: <i>Immunoglobulin G</i>)

IgM	Imunoglobulina M (do inglês: <i>Immunoglobulin M</i>)
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês: <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
LAMP	Amplificação isotérmica mediada por <i>loop</i> (do inglês: <i>Loop-Mediated Isothermal Amplification</i>)
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LOD	Limite de detecção (do inglês: <i>Limit of Detection</i>)
LOQ	Limite de quantificação (do inglês: <i>Limit of Quantification</i>)
LUMO	Orbital de mais baixa energia ocupado (do inglês: <i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>)
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
mAb-K39	Anticorpo monoclonal anti proteína K39 (do inglês: <i>Monoclonal Antibody of K39</i>)
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MOT	Teoria do orbital molecular (do inglês: <i>Molecular Orbital Theory</i>)
MS	Ministério da Saúde do Brasil
NaPSS	Poli(4-estirenosulfonato de sódio) (do inglês: <i>Sodium Polystyrene Sulfonate</i>)
NPs	Nanopartículas metálicas (do inglês: <i>Nanoparticles</i>)
OCP	Potencial de circuito aberto (do inglês: <i>Open Circuit Potential</i>)
ODS	Objetivos do Desenvolvimento Sustentável
OMS	Organização Mundial da Saúde

ONU	Organização das Nações Unidas
pAb-C1	Anticorpo policlonal anti proteína C1 (do inglês: <i>Polyclonal Antibody of C1</i>)
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês: <i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês: <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PCR-RFLP	Reação em cadeia da polimerase-polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (do inglês: <i>Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
PoCT	Teste no local de uso (do inglês: <i>Point-of-care Testing</i>)
PPy	Polipirrol (do inglês: <i>Polypyrrole</i>)
Py	Pirrol (do inglês: <i>Pyrrole</i>)
Q_{dl}	Capacitância da dupla camada elétrica
Q_{lf}	Capacitância de baixa frequência
rC1	Proteína recombinante C1 (do inglês: <i>Recombinant Protein C1</i>)
R_{ct}	Resistência de transferência de carga
rDNA	Ácido desoxirribonucleico recombinante (do inglês: <i>Recombinant DNA</i>)
RFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (do inglês: <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
rK39	Proteína recombinante K39 (do inglês: <i>Recombinant Protein K39</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês: <i>Ribonucleic Acid</i>)
R_s	Resistência ôhmica
SAMs	Monocamadas auto-organizadas (do inglês: <i>Self-assembled Monolayers</i>)

VC

Voltametría cíclica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 ESTADO DA ARTE	21
2.1 DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS: DESAFIO PERSISTENTE PARA A SAÚDE GLOBAL	21
2.1.1 Avanços no combate às DTNs e estratégias globais	22
2.1.1.1 O caminho a seguir: desafios e perspectivas	23
2.1.2 Leishmaniose.....	24
2.1.2.1 Leishmaniose visceral.....	25
2.1.2.2 Epidemiologia e expansão urbana no Brasil.....	26
2.1.2.3 Métodos diagnósticos	30
2.1.2.4 Uso de proteínas recombinantes	33
3 BIOSSENSORES	36
3.1 BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS.....	37
3.1.1 Espectroscopia de impedância eletroquímica	39
4 POLÍMEROS CONDUTORES.....	46
4.1 ESTRUTURA MOLECULAR ORGÂNICA	46
4.2 ESTRUTURA ELETRÔNICA DE POLÍMEROS CONDUTORES	48
4.3 POLIPIRROL	50
5 OBJETIVOS	54
5.1 OBJETIVO GERAL	54
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	54
6 MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
6.1 REAGENTES, SOLUÇÕES E MATERIAIS	55
6.2 AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	56
6.2.1 Pares antígeno-anticorpo.....	56
6.2.2 Soros caninos	56
6.3 EQUIPAMENTOS E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DE MEDIDAS	57
6.4 ELETRODEPOSIÇÃO	58
6.4.1 Polipirrol e nanopartículas metálicas de ouro	58
6.5 BIOFUNCIONALIZAÇÃO DAS PLATAFORMAS DESENVOLVIDAS PARA CONSTRUÇÃO DOS BIOSSENSORES	59
7 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	62

7.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO PPy:PSS E PPy:PSS-AUNPS	62
7.1.1 Estudo de diferentes densidades de carga de deposição para formação de PPy:PSS	62
7.1.2 Formação e caracterização de PPy:PSS-AuNPs	68
7.1.3 Construção de um imunossensor impedimétrico utilizando a proteína recombinante K39	74
7.1.4 Construção de um imunossensor impedimétrico utilizando a proteína recombinante C1	79
7.1.5 Uso dos biossensores construídos com as proteínas recombinantes K39 e C1 para detecção de anticorpos em soros caninos	82
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças tropicais largamente disseminadas, que ainda são consideradas negligenciadas e representam um problema sério de saúde pública. O agente etiológico é um parasita protozoário do gênero *Leishmania* e a doença se manifesta em diferentes formas clínicas, sendo as apresentações mais comuns a forma cutânea, mucocutânea e a visceral, sendo a leishmaniose visceral (LV) a forma mais grave, pois apresenta elevado índice de mortalidade e está intimamente relacionada à situação socioeconômica da região. Dentre as doenças tropicais negligenciadas, a LV se destaca com o segundo maior índice de mortalidade, sendo endêmica em várias localidades no mundo especialmente em regiões tropicais e subtropicais (JAIN et al., 2021; MITRA; MAWSON, 2017; PAUL; SINGH, 2023; WAMAI et al., 2020).

O agente etiológico mais comumente encontrado nas Américas é a espécie *Leishmania infantum*, transmitida ao homem por insetos vetores, como os flebotomíneos. A transmissão acontece quando o mosquito infetado introduz o protozoário em um indivíduo no momento que se alimenta do seu sangue. Neste contexto, os cães e outros canídeos representam os principais hospedeiros para esse parasita, por conseguinte, o número de animais infectados constitui um problema de disseminação da doença para humanos (BÉLARD et al., 2021; CAVALCANTE et al., 2020; PAUL; SINGH, 2023). Desse modo, o diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) é essencial, tanto no que diz respeito aos programas de vigilância da doença quanto ao abate dos cães, que apesar de trágico ainda é uma medida de controle no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024a).

De acordo com o Ministério da Saúde, o diagnóstico da leishmaniose é baseado em exames imunológicos e parasitológicos, os quais são considerados métodos de referência: padrão ouro (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024a). Entretanto, a sensibilidade destes métodos sofre variação, uma vez que a densidade de distribuição dos parasitas não é homogênea sobre o tecido celular avaliado no exame. Em rotinas clínicas, o ensaio imunoenzimático, a reação de imunofluorescência indireta e o ensaio imunocromatográfico são tradicionalmente empregados (IBARRA-MENESES; MORENO; CARRILLO, 2020; KUMAR; PANDEY; SAMANT, 2020; MIHALCA et al., 2019). Estes métodos sorológicos constituem importantes aliados no imunodiagnóstico da LV por se tratar de uma doença que tem como principal

característica uma grande produção de anticorpos específicos contra os antígenos parasitas e pelo estímulo de células B policlonais nos hospedeiros. Os métodos sorológicos permitem o uso de diferentes formas antigênicas, como extratos brutos ou solúveis que, apesar das vantagens associadas, possuem limitações importantes como ocorrência de reação cruzada com outras parasitoses e baixa sensibilidade para detecção em cães e indivíduos em casos assintomáticos da doença (SIQUEIRA et al., 2021).

Uma alternativa amplamente utilizada tem sido o uso de proteínas recombinantes como estratégia para melhora na qualidade dos testes diagnósticos, promovendo um aumento na sensibilidade e especificidade (JAMEIE et al., 2021). Dentro desse contexto, a opção antigênica mais utilizada nos diagnósticos de LV é a proteína recombinante K39, se destacando dos outros antígenos por sua boa capacidade de discriminar pacientes com LV de pacientes saudáveis (SIQUEIRA et al., 2021). Entretanto, apesar do grande avanço nos últimos anos, o diagnóstico eficaz da LV, com resultados excelentes em termos de especificidade e sensibilidade, ainda configura uma atividade desafiadora (DE SOUZA et al., 2019; SOUTO, 2016)

A produção de novos antígenos de *L. infantum*, como proteínas recombinantes com elevados potenciais antigênicos, apresenta-se como uma área da biologia molecular bem estabelecida, com especial destaque à tecnologia do DNA recombinante para produção destas estruturas e sua posterior avaliação em imunodiagnóstico a fim de possibilitar uma avaliação mais assertiva, conduzindo a uma abordagem terapêutica mais eficiente, até mesmo em casos assintomáticos da doença (PEREIRA et al., 2020; SOUTO, 2016).

Com relação à terapia, no Brasil, as opções utilizadas no tratamento da LV possuem toxicidades elevadas e podem apresentar sérios eventos adversos, a depender da faixa etária, comorbidades e perfil de toxicidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024a). Dessa forma, a partir das estatísticas associadas à incidência e mortalidade causadas pela doença, é essencial um diagnóstico eficaz de modo a favorecer uma melhor estratégia de tratamento.

O desenvolvimento de novas ferramentas diagnósticas para identificação da LV de forma rápida e eficaz se faz mais que oportuna: urgente. Sob esse aspecto, os biossensores de modo geral se apresentam como alternativa de grande interesse e, nos últimos anos, têm sido aplicados no diagnóstico clínico de uma vasta lista de

patologias, indo desde câncer¹ (AMETHIYA et al., 2022; LI et al., 2023; LOO; PUI, 2020; MUKHERJEE et al., 2024; SCOTT, 2010; SUN et al., 2025), síndrome respiratória causada pelo vírus SARS-CoV-2 (HRYNIEWICZ et al., 2022; KHAN et al., 2024; KUMAR et al., 2025; RONG et al., 2023; SOARES et al., 2022; ZENG et al., 2022), até seu emprego em doenças tropicais negligenciadas² (DE LUNA et al., 2025; LEE et al., 2020; LEY et al., 2022; LIMA et al., 2021; OGUNMOLASUYI; ADEWOYIN, 2024; SAPNA et al., 2024).

Pode-se destacar a potencial contribuição de técnicas com princípio de transdução eletroquímico para desenvolvimento de biossensores com sensibilidade e especificidade superiores aos métodos comumente empregados no diagnóstico da LV, além da possibilidade da construção de dispositivos portáteis e de baixo custo para aplicações no ponto de atendimento ao paciente (CAMPUZANO et al., 2021; KIM; JEONG; KO, 2024). Dentre as técnicas eletroquímicas, a espectroscopia de impedância eletroquímica apresenta excelente capacidade de monitoramento de processos superficiais e interfaciais, inclusive quanto aos processos relacionados à caracterização e detecção de reações biomoleculares (ROBINSON; JUSKA; O'RIORDAN, 2023; ŠTUKOVNIK; FUCHS-GODEC; BREN, 2023; ULLAH et al., 2022).

Com relação à etapa de construção de um biossensor, a funcionalização de superfícies metálicas é fundamentalmente importante para ancoramento (imobilização) do elemento de reconhecimento (ROBINSON; JUSKA; O'RIORDAN, 2023), destacando o uso de polímeros condutores para essa finalidade (FIGUEIREDO et al., 2023; HAN et al., 2022; HRYNIEWICZ et al., 2022; MENG et al., 2024; TRAN et al., 2021; WALTER et al., 2020); uso que pode se estender também a superfícies não metálicas (VAIDYA; SAHOO; SHENDE, 2025). Atualmente, dentre os materiais poliméricos empregados, o polipirrol vem recebendo atenção devido à facilidade de síntese, estabilidade química e mecânica, e condutividade elétrica. Ainda, o polipirrol possui comportamento eletroativo em solução tampão, justificando seu uso em

1 Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o câncer é um conjunto de doenças crônico-degenerativas que induzem, de modo desordenado, o crescimento de células incomuns, invadindo tecidos e órgãos cuja dinâmica de proliferação apresenta comportamento agressivo e incontrolável.

2 Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças tropicais negligenciadas correspondem a um grupo de infecções de ordem bacteriana, parasitária, viral e fúngica que possuem prevalência em países tropicais e subtropicais em desenvolvimento.

biossensores que não dependem de sonda eletroquímica na etapa de detecção (VAIDYA; SAHOO; SHENDE, 2025).

De modo a corroborar com as propriedades eletrônicas intrínsecas do polipirrol, uma estratégia utilizada é a associação de nanopartículas metálicas para promover uma melhora significativa no desempenho do material devido aos efeitos sinérgicos entre o polímero e as nanopartículas metálicas. Um dos materiais mais utilizados são as nanopartículas de ouro, as quais por possuírem elevada área superficial possibilitam um aumento expressivo nas propriedades de transporte eletrônico, biocompatibilidade e, ainda, por permitirem a formação de uma nova camada a partir da funcionalização de sua superfície, de forma a propiciar uma ligação mais orientada do bioreceptor no processo de construção de um biossensor (KARNWAL et al., 2024; SAHA et al., 2012; ZHANG et al., 2020).

No presente trabalho de doutorado, visando uma estratégia alternativa para o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina, biossensores foram desenvolvidos a partir da biofuncionalização de diferentes proteínas recombinantes sobre eletrodos descartáveis funcionalizados com nanoestruturas de polipirrol decoradas com nanopartículas de ouro, explorando a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica como sistema de transdução.

2 ESTADO DA ARTE

2.1 DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS: DESAFIO PERSISTENTE PARA A SAÚDE GLOBAL

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) correspondem a um grupo de infecções de ordem viral, bacteriana, fúngica e parasitária, **Figura 1**, que possuem prevalência em países tropicais e subtropicais em desenvolvimento. Devido à falta de investimentos em políticas públicas de prevenção e controle, acabam contribuindo para uma maior desigualdade social por afetar de maneira mais efetiva populações que vivem em um quadro de pobreza expressiva (MAGALHÃES et al., 2023). Esse conjunto de doenças possui relação direta com as condições precárias de saneamento básico, acesso limitado a serviços de saúde – mesmo que públicos, e principalmente, vulnerabilidade social; fatores estes que contribuem para sua propagação e manutenção ao longo do tempo.

Figura 1 - Doença, vetor causador, patógeno e via de transmissão de algumas das principais doenças tropicais negligenciadas.

Doença	Vetor	Patógeno	Transmissão
Dengue	 <i>Aedes aegypti</i>	 Virus da dengue	 Vetor de transmissão
Tuberculose	 Bacilo de Koch	 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	 Vetor de transmissão
Chagas	 Triatomíneo	 <i>Trypanosoma sp.</i>	 Transmissão oral Vetor de transmissão
Leishmaniose	 Flebotomíneo	 <i>Leishmania sp.</i>	 Vetor de transmissão

Fonte: O autor (2025).

Apesar de seu impacto significativo, tanto na morbidade quanto na mortalidade em índices globais, as doenças tropicais negligenciadas durante muito tempo acabaram por não receber devida atenção como outras doenças infecciosas, a exemplo HIV/AIDS e, mais recentemente, a pandemia da COVID-19 (TOOR et al., 2021).

Nesse sentido, uma vez reconhecida a gravidade, a Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2016 apresentou um portfólio com 20 doenças que compõe o grupo das DTNs, em que compartilham características como alta incidência em regiões tropicais, grande impacto social e econômico e escassez de investimentos em prevenção e controle. Entre essas doenças estão a dengue, tuberculose, chagas e leishmaniose. Embora cada uma destas doenças possuam características etiológicas, epidemiológicas e clínicas distintas, todas compartilham um ponto que as define: o impacto sobre populações mais pobres, onde, coletivamente, acabam por afetar mais de 1 bilhão de pessoas no mundo todo, trazendo consequências devastadoras para os campos da saúde, social e econômico destes grupos afetados (ENGELS; ZHOU, 2020; MALECELA; DUCKER, 2021).

2.1.1 Avanços no combate às DTNs e estratégias globais

Desde 2010, progressos significativos foram conquistados no enfrentamento às DTNs, impulsionados por esforços globais coordenados entre a OMS, governos, instituições acadêmicas e organizações não governamentais. Dois anos depois, a OMS publicou um plano de ação voltado à prevenção, controle, eliminação e erradicação dessas doenças, estabelecendo metas ambiciosas para a década seguinte. Visando intensificar essas ações, a OMS lançou o plano de ação para as DTNs 2021-2030, que possui o objetivo de reforçar as estratégias anteriormente implementadas e acaba por propor novas abordagens para ampliar o acesso ao diagnóstico e tratamento. Ainda, há a definição de metas transversais, alinhadas com o 13º Programa Geral de Trabalho da OMS (2019-2023) e com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS): coleção de 17 metas globais estabelecidas pela Organização das Nações Unidas (ONU); demonstrando a interdependência entre a erradicação das DTNs e o combate à pobreza e à desigualdade social (MALECELA; DUCKER, 2021).

Entre as principais metas estabelecidas para a próxima década, as de maior destaque são (DEPARTAMENTO DE ASSUNTOS ECONÔMICOS E SOCIAIS, 2025):

- i. Redução da carga global das DTNs por meio da ampliação do acesso ao diagnóstico e tratamento eficaz;
- ii. Cessar a transmissão de, pelo menos, uma doença em 100 países endêmicos até 2030;
- iii. Implementação de ações intersetoriais, visando integrar políticas de saúde, educação, saneamento e desenvolvimento econômico para um enfrentamento mais eficaz;
- iv. Aprimorar a vigilância epidemiológica, garantindo melhor monitoramento e resposta a surtos e novas ameaças.

De modo geral, este plano de ações propõe estratégias para alcançar essas metas na próxima década (MALECELA; DUCKER, 2021). Ademais, novas parcerias têm se mostrado fundamentais para promover o desenvolvimento de vacinas, fármacos, terapias inovadoras e ferramentas de diagnóstico mais acessíveis, favorecendo significativamente o cenário das DTNs.

2.1.1.1 O caminho a seguir: desafios e perspectivas

Mesmo que avanços significativos tenham sido alcançados, diversos desafios ainda dificultam a erradicação das DTNs como: financiamento limitado, falta de infraestrutura adequada nos países com maiores índices e, mais preocupantemente, a resistência de alguns patógenos às terapias convencionais, configurando obstáculos que precisam ser superados. E, para que as metas estabelecidas pela OMS sejam atingidas até 2030, é essencial que governos e instituições associadas ampliem os investimentos em pesquisa e desenvolvimento, trabalhando para fortalecer políticas públicas de controle e integrem estratégias garantindo que o enfrentamento às DTNs seja uma prioridade.

Além disso, algumas doenças como leishmaniose visceral e a esquistossomose, vêm se expandindo, tornando-se um problema crescente em cidades em que a urbanização desordenada e as condições precárias de saneamento

básico favorecem a proliferação de vetores (BORGES et al., 2022; FURTADO et al., 2022).

2.1.2 Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada distribuída por mais de 90 países no mundo todo e que, principalmente, é relatada nas regiões do sudeste da Ásia, leste do continente africano e no Brasil. Possui uma prevalência estimada de cerca de 12 milhões de casos no mundo (COSTA-DA-SILVA et al., 2022). É uma doença infecciosa causada por um parasita protozoário do gênero *Leishmania*, se manifestando a partir de quatro formas: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose cutânea difusa (LCD), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose visceral (LV).

A leishmaniose cutânea é considerada a apresentação mais comum das leishmanioses, em que sua característica clínica são lesões ulceradas não-letais na pele e é primariamente causada pela *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica* nos continentes africano, asiático e sul da Europa. Já na América Latina, as responsáveis são *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. panamensis* e *L. guyanensis*. A leishmaniose cutânea difusa é uma forma atípica da cutânea, em que as lesões se apresentam com parasitas e múltiplos nódulos, com infiltração da pele e sem ulceração, ao contrário da LC. Nas Américas as espécies causadoras são a *L. mexicana* e *L. amazonensis* e; na África e Ásia a espécie *L. aethiopica*. A apresentação mucocutânea é a progressão da cutânea para regiões de mucosa e que causam desfiguração e as espécies associadas são a *L. braziliensis* e, eventualmente, por *L. panamensis* ou *L. guyanensis* (COSTA-DA-SILVA et al., 2022; FURTADO et al., 2022).

A leishmaniose visceral é a forma clínica mais severa e grave das leishmanioses por ser uma infecção sistêmica e potencialmente fatal. Causada pela espécie *L. infantum* nas Américas e *L. dovani* nos continentes africano e asiático, acabando por contribuir com cerca de 90% dos óbitos relatados (COSTA-DA-SILVA et al., 2022; DUARTE et al., 2025; VIEIRA, 2023).

2.1.2.1 Leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral atinge mais de 80 países em todo o mundo e, segundo dados da OMS, os casos mundiais mais expressivos reportados para LV nos últimos 5 anos são apresentados na **Tabela 1**. Dos 84 países listados pela OMS, o Brasil ocupa o 3º lugar geral em casos de incidência majoritária reportados, com contribuição global de 14,91% com base na última estatística apresentada para o ano de 2023 considerando os casos mais expressivos da doença. Outro fator importante a se destacar são os países do continente africano, que correspondem a 85,08% dos casos reportados. Essa estatística de casos reportados, apesar de ser consideravelmente alta, acaba por não refletir a totalidade da situação, uma vez que não leva em consideração os índices de casos subnotificados.

Tabela 1 – Número absoluto de casos de leishmaniose visceral reportados. Data da última atualização: 20/11/2024.

País	2019	2020	2021	2022	2023
Sudão	2.851	2.563	3.323	4.233	3.571
Etiópia	1.360	1.077	794	919	1.482
Brasil	2.526	1.954	1.492	1.684	1.461
Quênia	1.621	1.178	1.746	1.573	1.252
Sudão	1.013	827	792	1.074	778
Somália	294	471	831	793	712
Índia	2.882	2.040	1.187	777	538

Fonte: (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2024).

Apesar de as estatísticas globais apresentarem casos majoritários para países do continente africano, além do Brasil, nos últimos anos um número crescente de casos nos Estados Unidos foi evidenciado. O aumento, embora bem menos pronunciado quando comparado a outras partes do mundo, sinaliza uma mudança significativa no padrão epidemiológico. Historicamente, os casos de leishmaniose visceral nos EUA foram classificados como esporádicos, uma vez que o diagnóstico ocorria em pessoas que haviam viajado ou aquelas que retornavam de missões militares de regiões endêmicas. No entanto, nas últimas décadas foram observados casos autóctones e, embora o número de infecções seja relativamente baixo, os mais representativos correspondem aos da região do sul do país e em áreas ao longo da fronteira entre os EUA com o México (CURTIN; ARONSON, 2021). A alteração nos padrões climáticos em virtude do aquecimento global acabou por favorecer a expansão de áreas que são benéficas para a proliferação de potenciais vetores, como

os flebotomíneos. Nisso, regiões que anteriormente não eram consideradas endêmicas passam a ser ambientes propícios, ampliando o risco de transmissão. Ainda, em virtude da migração internacional, a disseminação da leishmaniose visceral se estende a animais domésticos, como cães, que podem carregar o parasita, contribuindo para a propagação da doença especialmente em áreas urbanas cuja densidade populacional é relativamente expressiva (CURTIN; ARONSON, 2021; DANTAS-TORRES, 2024).

Outros fatores relevantes para o aumento dos casos dizem respeito ao desmatamento e urbanização e, como agravante, a leishmaniose visceral é uma doença rara nos EUA e isso implica em um subdiagnóstico (CURTIN; ARONSON, 2021). Na Europa, os casos têm aumentado expressivamente nos últimos anos, especialmente em países da região sul, como Grécia, Portugal, Espanha e Itália e em regiões que não eram consideradas endêmicas devido às mudanças climáticas, de comportamento e aumento da mobilidade urbana (MAIA et al., 2023; ÖZBILGIN et al., 2023). Portanto, fatores como mudanças climáticas, mobilidade urbana e animal, desmatamento e urbanização bem como deficiência no diagnóstico e conhecimento local são fortes contribuintes para o crescimento dos casos (CURTIN; ARONSON, 2021; DANTAS-TORRES, 2024; MAIA et al., 2023).

2.1.2.2 Epidemiologia e expansão urbana no Brasil

Os aspectos epidemiológicos da leishmaniose são complexos porque dependem de diversos fatores: biológicos, ambientais e sociais, que acabam por influenciar na distribuição geográfica, na diversidade de espécies e de vetores, na presença de reservatórios animais e na dinâmica de transmissão (VIEIRA, 2023).

A partir da década de 70, observou-se uma mudança no perfil epidemiológico da leishmaniose visceral no Brasil, onde passou de uma doença considerada tipicamente rural para um processo de urbanização em andamento. As primeiras epidemias urbanas foram registradas na cidade do Rio de Janeiro em 1970, nos bairros da zona oeste, sem histórico anterior de LV, e em Teresina, entre 1980 e 1986, quando a doença, inicialmente era limitada às áreas rurais, acabando por se expandir para áreas periféricas da cidade (CARVALHO et al., 2022; GUTIÉRREZ et al., 2024; MARZOCHI et al., 2023).

Desde então, a doença vem se expandindo para os centros urbanos das regiões Norte, Sul, Sudeste e Centro-Oeste do país. Essa urbanização da leishmaniose visceral e sua dispersão geográfica para áreas anteriormente livres da doença impõem vários desafios relacionados ao deslocamento do vetor e dos cães infectados, reforçando a necessidade de medidas de controle com um amplo alcance geográfico, que devem ser contínuas ao longo do tempo (MARZOCHI et al., 2023).

As medidas de vigilância e controle da leishmaniose visceral humana e canina no Brasil são essenciais e incluem diagnóstico precoce e tratamento, além da busca ativa de casos. Entretanto, apesar dos grandes esforços envolvidos e das metas da OMS e com os ODS da ONU, o controle da LV encontra dificuldades devido a fatores complexos envolvendo a dinâmica de transmissão da doença, além das dificuldades na implementação e manutenção deste controle por longos períodos (MARZOCHI et al., 2023).

Segundo dados disponibilizados em plataforma integrada pelo Ministério da Saúde (MS), com data de última atualização em 20 de agosto de 2024, há uma certa divergência com os dados apresentados pela OMS, com última data de atualização em 20 de novembro de 2024, apresentado um valor acima do reportado, de 1.720 casos para o ano de 2023 e 577 casos para o ano de 2024 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024c), em que a subnotificação corrobora para essa divergência de casos reportados. Ainda, dados do MS dos últimos anos revelam a urbanização da leishmaniose visceral, **Figura 2**, onde também é possível verificar os casos e coeficiente de incidência no país, **Figura 3 (A)**. O coeficiente de incidência aqui é definido como número de casos devidamente constatados por cada 100.000 habitantes. Outros parâmetros a serem considerados são óbitos e taxa de letalidade, que, apesar de todos os esforços empregados pelos órgãos de saúde, caminham para um cenário favorável de acordo com o plano de ação para as DTNs entre 2021-2030, **Figura 3 (B)**.

De acordo com o apresentado na **Figura 2**, a região Nordeste do país possui o maior número de casos ao longo dos anos considerados na evolução temporal, de 2007 a 2024, com uma tendência de aumento até cerca de 2014. Após esse período, a região mostrou uma queda constante nos casos registrados, se intensificando a partir de 2018 e com uma redução mais acentuada nos últimos anos.

De maneira similar, a região Norte sofreu com aumento de casos até 2014, apresentando uma queda gradual nos anos seguintes. Essa tendência se mantém estável a partir de 2021 com casos constantes. A região Sudeste, apresenta um padrão de crescimento nos primeiros anos considerados, porém moderado. A partir de 2014 há uma significativa diminuição nos casos reportados e essa queda se mantém até os dados disponíveis de 2024. Já a região Centro-Oeste, apresenta um aumento de casos até meados de 2013, seguido de uma diminuição mais pronunciada a partir do ano seguinte, 2014. A região mantém a tendência de redução similar às outras regiões mantendo os casos constantes a partir de 2021. Por fim, para a região sul do país, é possível verificar que os números de casos são expressivamente mais baixos quando comparados as outras regiões, além de não apresentar picos de incidência significativos.

Figura 2 - Casos de leishmaniose visceral por região de infecção e ano.



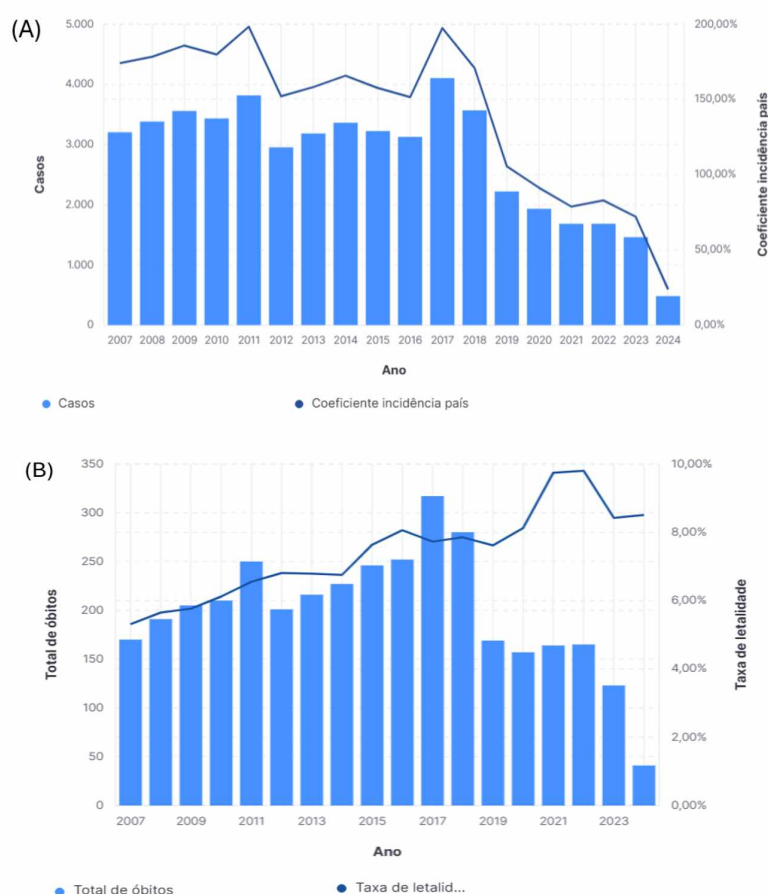
Fonte: (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024c).

Na **Figura 3 (A)** é possível observar que, entre 2007 e 2017, há uma variação no número de casos de cerca 3.000 para mais de 4.000, com uma tendência de queda a partir de 2017. O pico no ano de 2017 reflete o pior cenário que o território brasileiro experienciou. Ainda, como apresentado, há uma redução progressiva no número de casos registrados, a partir dos dados para os anos de 2023 e 2024, indicando uma diminuição considerável e um cenário mais favorável no contexto das DTNs. Adicionalmente, o coeficiente de incidência segue a tendência inversa do número de casos, porém, de maneira similar atinge um pico no ano de 2017, indicando um aumento significativo. A partir de 2018, há uma queda acentuada, reflexo da

diminuição do número de novos casos e, possivelmente, efeito positivo das políticas públicas de controle e prevenção.

Em relação ao total de óbitos e taxa de letalidade, **Figura 3 (B)**, o aumento nesses dois parâmetros com pico em 2017 pode ser resultado de uma combinação de fatores, como aumento da incidência de casos graves de LV, dificuldades de acesso ao sistema de saúde e opções terapêuticas ou até mesmo surto. Após esse ano, a queda no número de óbitos e taxa de letalidade podem ser indicativos de intervenções implementadas a partir desse período, além do controle de reservatórios, como cães infectados. A taxa de letalidade apresenta uma flutuação a partir de 2020, sugerindo que ainda existam questões de ajuste nas políticas públicas implementadas para controle dessa doença, entretanto, essa variação também pode ser influenciada pelo cenário da pandemia da COVID-19 (CARVALHO et al., 2020; PAUL; SINGH, 2023).

Figura 3 - (a) Casos e taxa de incidência de leishmaniose visceral por ano de notificação e coeficiente de incidência (por 100.000 habitantes) e (b) Óbitos e taxa de letalidade.

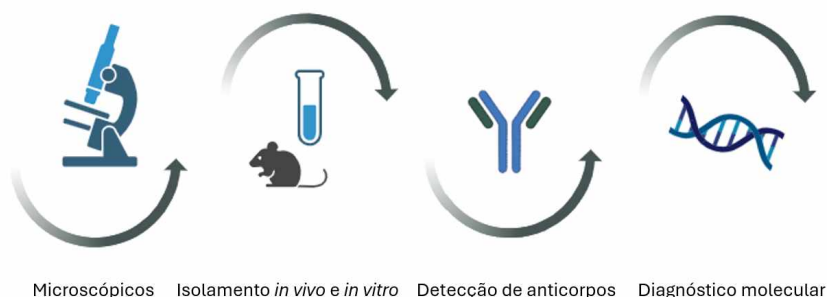


Fonte: (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024c).

2.1.2.3 Métodos diagnósticos

Os métodos diagnósticos disponíveis para detecção e quantificação da leishmaniose visceral incluem ensaios parasitológicos, imunológicos e moleculares. Na **Figura 4** é apresentado um esquema dos principais métodos diagnósticos para LV em rotinas laboratoriais. Os ensaios microscópicos se baseiam na visualização direta de amastigotas (forma intracelular do parasita) em amostras de tecidos coradas com Giemsa ou hematoxilina-eosina. Essa estratégia é um método rápido e acessível, porém sua sensibilidade é limitada, especialmente em casos em que a carga parasitária é baixa. No isolamento *in vitro* e *in vivo*, a promastigota (forma extracelular do parasita) pode ser cultivada em meio bifásico com base de ágar-sangue, podendo também ser isolada em modelos animais, como camundongos e hamsters. Esse método é útil para confirmar a presença do parasita, mas pode ser demorado e requer um laboratório com infraestrutura adequada (LÉVÊQUE et al., 2020; REIMÃO et al., 2020).

Figura 4 - Métodos diagnósticos laboratoriais empregados para leishmaniose visceral.



Fonte: O autor (2025).

O diagnóstico suportado na detecção de anticorpos é baseado nas técnicas mais comuns como o ensaio imunoenzimático (ELISA, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) utilizado na detecção de anticorpos contra proteínas recombinantes, como a K39. E, ainda os imunocromatográficos que são baseados em antígenos recombinantes. Apesar de útil, a sorologia pode apresentar eventos de reações cruzadas com outras doenças. Ainda, o diagnóstico molecular que se baseia na amplificação do DNA do parasita, cujas técnicas mais empregadas são o PCR-RFLP (do inglês *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length*

Polymorphism), PCR em tempo real (qPCR), LAMP (do inglês *Loop-mediated Isothermal Amplification*), oferecendo alta sensibilidade e especificidade, porém requer equipamentos sofisticados e um alto custo (REIMÃO et al., 2020).

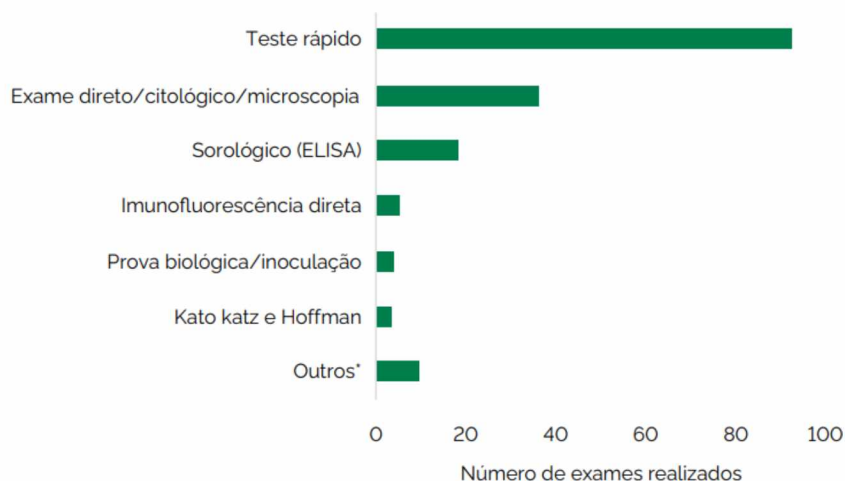
Conforme mencionado anteriormente, o diagnóstico adotado pelo MS é baseado em exames imunológicos e parasitológicos, porém são metodologias diagnósticas caras e necessitam de mão-de-obra centrada em grandes regiões e especializada. Segundo último boletim epidemiológico do MS que versa sobre estrutura e atividades das unidades de vigilância e zoonoses no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024b), nos últimos anos a adoção de testes rápidos como estratégia diagnóstica em solução à descentralização dos métodos tradicionais vem ganhando destaque.

Na **Figura 5** é possível observar o predomínio no uso dos testes rápidos, com um número significativamente maior de exames realizados em comparação aos demais métodos considerados. Esse cenário pode estar associado a facilidade de aplicação, rapidez no resultado e menor necessidade de infraestrutura laboratorial. Embora sejam convenientes, sua sensibilidade e especificidade podem variar a depender do tipo de antígeno ou anticorpo detectado. Seguindo, o exame direto/citológico/microscópico é o segundo mais utilizado, o que reflete sua importância como método diagnóstico e, embora possa ter alta especificidade, sua sensibilidade pode ser limitada, especialmente em casos de baixa carga parasitária. Adicionalmente, a microscopia requer treinamento especializado e pode ser bem mais demorada quando comparada aos testes rápidos. O uso moderado de métodos sorológicos baseado no ELISA fica evidenciado e, apesar da importância na detecção de anticorpos, pode apresentar limitação em relação à diferenciação de infecção ativa, detecção de anticorpos do tipo IgM, e exposição passada ao parasita, detecção de anticorpos do tipo IgG.

A baixa utilização dos métodos de imunofluorescência direta, prova biológica/inoculação e Kato-Katz e Hoffman pode estar associado ao uso de equipamentos específicos, infecção experimental de animais de laboratório e confusão no diagnóstico de parasitoses intestinais, podendo indicar que parte do exame se refere a coinfeções, respectivamente. Os outros métodos diagnósticos, a saber, correspondem a imunofluorescência indireta, parasitológico, hemograma e

bioquímico, exame larval, identificação microscópica vetorial, qualidade da água e testes moleculares.

Figura 5 - Tipos de exames realizados em 94 de 287 unidades de vigilância de zoonoses no Brasil: ano referência de 2022.



Fonte: (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024b).

Portanto, é interessante verificar que os testes rápidos vêm sendo amplamente utilizados devido à sua praticidade, entretanto, métodos diagnósticos mais específicos como microscopia e o ELISA desempenham um papel importante nesse contexto. Os métodos moleculares, como PCRs e imunofluorescências, são menos utilizados o que sugere que as limitações de custo e infraestrutura contribuem para essa estatística. Ainda, um ponto de atenção dentro do contexto de métodos diagnósticos é que um dos principais fatores limitantes destes ensaios se refere a forma antigênica utilizada, uma vez que muitos utilizam antígenos brutos ou seus extratos solúveis para imunodiagnósticos.

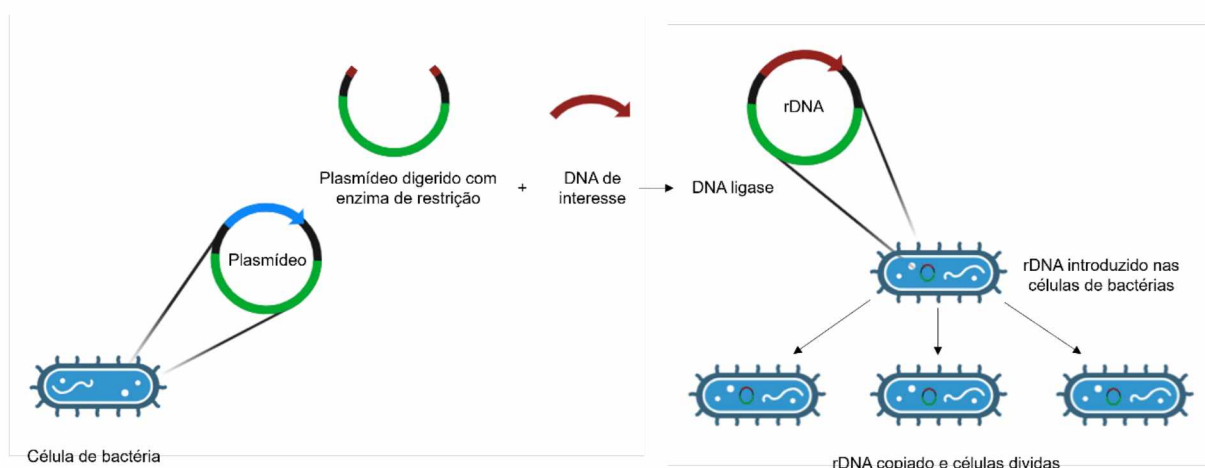
A utilização de peptídeos sintéticos e proteínas recombinantes em vez do uso de antígenos brutos promove uma melhora na especificidade dos testes diagnósticos, diminuindo de modo significativo eventos de reações cruzadas com outras doenças (BARMAN et al., 2023; NOYA et al., 2024; PANDEY; MALVIYA; DVORAKOVA, 2021). Entretanto, apesar dos avanços obtidos nos últimos anos, o diagnóstico da leishmaniose visceral continua sendo um desafio. Apesar disso, estes desafios associados incluem a detecção do agente etiológico e a identificação precisa da espécie responsável pela forma clínica da doença. Nesse sentido, o diagnóstico

diferencial é essencial, pois outras doenças podem apresentar aspectos clínicos semelhantes, como a doença de Chagas, esquistossomose, malária, entre outras. Em regiões endêmicas, os testes diagnósticos disponíveis podem ser limitados e depender mais dos recursos e infraestrutura disponíveis do que da própria precisão do método empregado (REIMÃO et al., 2020).

2.1.2.4 Uso de proteínas recombinantes

Proteínas recombinantes são estruturas produzidas a partir da expressão em meio de bactérias ou outros organismos utilizando a tecnologia do DNA recombinante (rDNA). A partir desta tecnologia a alteração deliberada no material genético de qualquer organismo é conduzida pela modificação direta do ácido nucleico, envolvendo práticas para análise ou união de fragmentos de DNA de um ou mais organismos, incluindo a introdução da molécula de rDNA em uma célula para replicação ou incorporação ao genoma da célula-alvo (BARMAN et al., 2023). O sistema de expressão mais comumente utilizado é em *Escherichia coli* (ZHANG et al., 2022). Na **Figura 6** é mostrado uma representação esquemática das etapas envolvidas na tecnologia do DNA recombinante para produção de proteínas.

Figura 6 - Representação esquemática dos processos associados na tecnologia de DNA recombinante para síntese de proteínas.



Fonte: O autor (2025).

O processo, como apresentado na **Figura 6**, consiste no isolamento do material genético e o consequente uso de enzimas de restrição para obtenção do gene que codifica a proteína de interesse e utilização da mesma enzima de restrição para

clivar o plasmídeo. Assim, a ligação do gene de interesse ao plasmídeo é realizada a partir da enzima DNA ligase, produzindo o DNA recombinante. Por fim, há a introdução deste rDNA na bactéria, *E. coli*, por exemplo, como meio de cultura apropriado para que ocorra o processo de divisão celular (BARMAN et al., 2023; GUPTA et al., 2016). E, após muitas gerações de bactérias, as proteínas recombinantes são purificadas.

Nos últimos anos, expressivas contribuições em relação a produção de proteínas recombinantes com o uso da tecnologia de rDNA foram alcançadas e isso tornou possível o emprego destas proteínas no imunodiagnóstico da leishmaniose visceral (FUJIMORI et al., 2023; SIQUEIRA, 2023). O uso de proteínas recombinantes em imunoenaios para fins diagnósticos possuem inúmeras vantagens em relação ao uso de antígenos brutos e/ou solúveis, possibilitando uma melhor precisão e confiabilidade do ensaio. Em primeiro lugar, proteínas recombinantes podem ser produzidas com um elevado grau de pureza e uniformidades estruturais, o que permite assegurar resultados consistentes. Adicionalmente, a produção destas proteínas permite um controle de qualidade mais rigoroso em relação ao processo de obtenção destas estruturas, permitindo garantir uma melhor qualidade e consistência da estrutura antigênica utilizada em imunoenaios. Em terceiro lugar, a possibilidade de modificações estruturais nas proteínas recombinantes permite otimizar sua eficácia a partir da introdução de sequência gênica específicas que promovem uma alta sensibilidade e especificidade para avaliação da interação antígeno-anticorpo. Ainda, por se tratar de estruturas que podem ser obtidas por métodos de biologia molecular, a expressão destas proteínas é uma alternativa estratégica uma vez que não fica limitada a sazonalidade e escassez como é o caso das proteínas obtidas a partir de fontes naturais. O quinto motivo se refere a minimização de contaminação cruzada uma vez que sistemas de expressão controlados minimizam o risco de contaminação por possíveis patógenos que são comumente encontrados em fontes naturais, possibilitando um melhoramento da especificidade dos imunoenaios. E, por fim, a produção em larga escala de proteínas recombinantes é mais econômica quando comparada ao processo de purificação em grande quantidade dos antígenos brutos a partir de fontes naturais (ANNY et al., 2024; GUPTA et al., 2016; LESTARI; NOVIENTRI, 2021; O'FLAHERTY et al., 2020; ZHANG et al., 2022).

Nesse sentido, o uso e desenvolvimento de novas estratégias de imunoenaios baseadas em proteínas recombinantes é uma alternativa amplamente

utilizada para diagnósticos não apenas da LV, mas como uma série de outras doenças. Ademais, ainda neste cenário, os biossensores se apresentam como novas possibilidades diagnósticas e emergem como uma tecnologia promissora, oferecendo soluções rápidas, precisas e acessíveis para corroborar com a melhoria na detecção (BORGES et al., 2020; PRADANAS-GONZÁLEZ et al., 2024) e diagnóstico diferencial da leishmaniose visceral (JAIN et al., 2021). Outro fator relevante é a viabilidade do uso de biossensores em regiões endêmicas, onde os recursos laboratoriais são frequentemente limitados. Diferentemente dos métodos diagnósticos tradicionais que exigem equipamentos e mão-de-obra especializada, essa nova possibilidade diagnóstica pode ser projetada para ser um dispositivo portátil e de fácil manuseio, possibilitando a sua aplicação em ambientes com infraestrutura reduzida. Além disso, por apresentarem tempo de resposta curto e baixo custo operacional, eles podem então ser implementados em programas de vigilância epidemiológica e no atendimento primário à saúde, favorecendo um diagnóstico precoce (YUNUS et al., 2023).

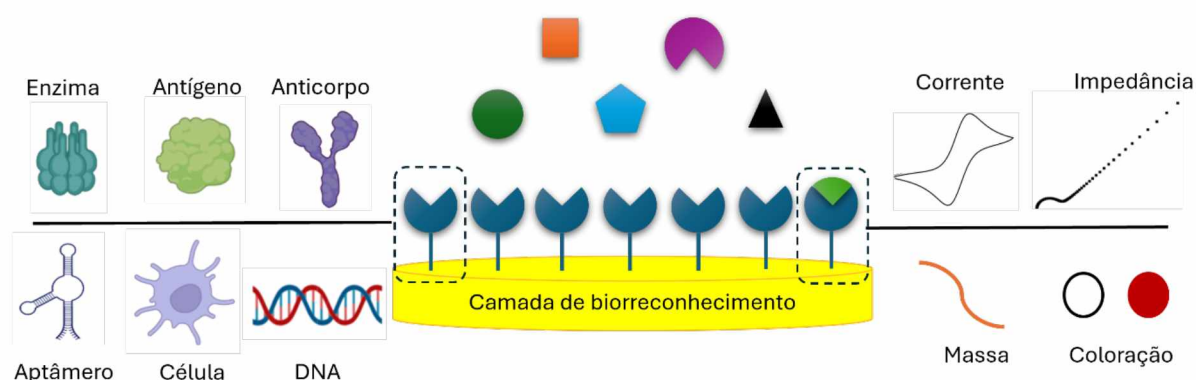
Portanto, de modo a corroborar para a melhorias das estatísticas globais associadas as DTNs e, tendo em vista o potencial emprego dos biossensores, faz-se oportuno o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico para leishmaniose visceral (CORDEIRO et al., 2020; LARIOS et al., 2021; MARTINS et al., 2024; OLIVEIRA; ZARBIN; SOUTO, 2024; VOLPE et al., 2024).

3 BIOSSENSORES

Segundo o compêndio de terminologia química proposto pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*), biossensor é um dispositivo eletrônico que usa reações bioquímicas específicas mediadas por enzimas, imunossistemas, tecidos, organelas ou células inteiras e que são capazes de converter a respostas destas interações biomoleculares a sinais mensuráveis (IUPAC, 2025).

Estruturalmente, um biossensor, **Figura 7**, é composto por duas partes fundamentais: a camada de biorreconhecimento e, por conseguinte, o elemento transdutor. A camada de biorreconhecimento corresponde a uma estrutura de origem biológica, também conhecida como biorreceptor, que contém um elemento que interage de maneira específica com o analito desejado, podendo ser anticorpos, antígenos, enzimas ou, até mesmo, material genético. No que diz respeito ao processo de transdução, o elemento transdutor é o responsável por transformar a informação da interação química específica entre a camada de biorreconhecimento e o analito em um sinal analítico útil, em que este sinal mensurável é obtido a partir de algum princípio físico-químico (HULANICKI; GLAB; INGMAN, 1991; THÉVENOT et al., 2001). Pode-se citar as técnicas eletroquímicas, colorimétricas ou piezoelétricas que são amplamente utilizadas como métodos de transdução.

Figura 7 - Figura-conceito de um dispositivo biossensor.



Fonte: O autor (2025).

A depender do tipo de elemento bioreceptor localizado na camada de biorreconhecimento, os biossensores podem ser classificados em: imunossensores,

genossensores, enzimáticos ou imunoenzimático; para receptores baseados em anticorpos e/ou antígenos, DNA/RNA, enzimas e anticorpos marcados com enzimas, respectivamente. Ainda, outra classificação dos biossensores diz respeito ao método de transdução utilizado em sua construção: se baseados em alteração de cor, variação de corrente e/ou impedância ou se baseados em alteração de massa; correspondente aos tipos colorimétrico, voltamétrico, impedimétrico e piezoelétrico, respectivamente.

3.1 BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS

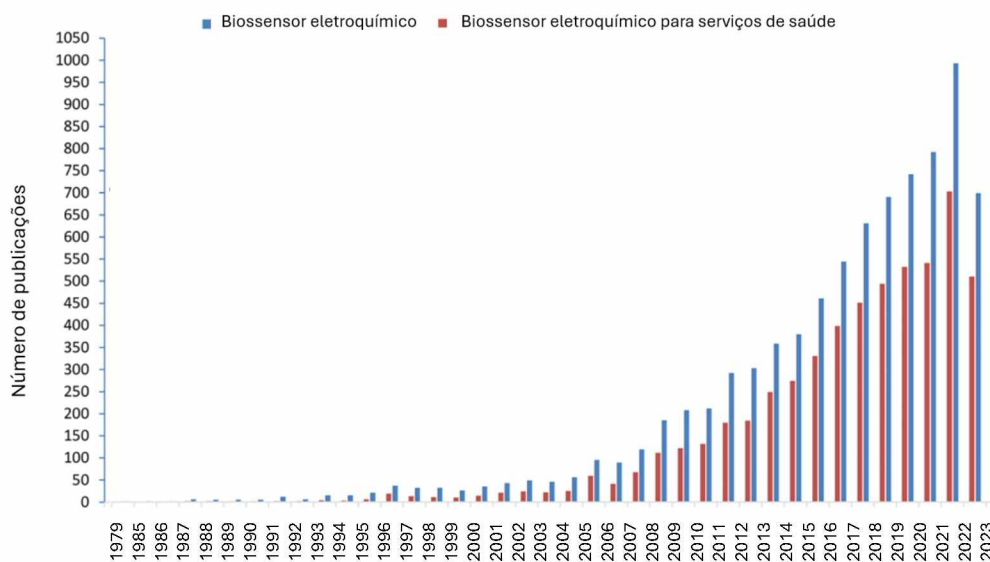
Biossensores eletroquímicos são dispositivos eletroanalíticos, que combinam elementos biológicos de reconhecimento com transdutores eletroquímicos para detecção específica de analitos com alta sensibilidade e especificidade. Eles desempenham um papel importante no avanço de possibilidade de diagnóstico alternativo, indo desde aplicações médicas, biomédicas, a monitoramento ambiental, segurança alimentar e detecção de biomoléculas em diversas áreas científicas e industriais (AKHLAGHI et al., 2024; STRADIOTTO; YAMANAKA; ZANONI, 2003; ZHANG et al., 2023). A crescente demanda por métodos rápidos, sensíveis e de baixo custo acabam por impulsionar a pesquisa e o desenvolvimento deste campo de pesquisa, além disso, a possibilidade de portabilidade, miniaturização e facilidade de uso os tornam potenciais candidatos para aplicações diagnósticas em campo e testes rápidos no ponto de atendimento (PoCT, do inglês *Point-of-Care Testing*) (AKHLAGHI et al., 2024; KIM; JEONG; 2024; ZHANG; ZHOU, 2022).

Em 2023, Yunus e colaboradores (YUNUS et al., 2023), publicaram uma análise bibliométrica sobre publicações científicas envolvendo biossensores eletroquímicos e, em paralelo, sobre biossensores eletroquímicos para serviços de saúde. Na **Figura 8** é apresentada a evolução temporal do número de trabalhos publicados. Desde a década de 80, do século passado, até meados da década de 2000, é possível observar um crescimento lento e gradual no número de publicações envolvendo biossensores eletroquímicos. A partir de 2005, esse número começa a aumentar significativamente, atingindo um pico em torno dos anos de 2019 a 2021, indicando um grande avanço na área. Esse aumento expressivo pode estar relacionado ao desenvolvimento de novos materiais nanoestruturados biossensíveis

e melhoramento das técnicas de detecção, possibilitando um diagnóstico mais preciso destes dispositivos eletroquímicos.

Paralelamente, o número de publicações sobre biossensores eletroquímicos em serviços de saúde acabou por acompanhar a tendência geral. Apesar disso, é possível verificar que há uma notável diferença entre o número total de publicações e aquelas focadas nestes dispositivos em serviços de saúde. O aumento no uso dos biossensores na área da saúde está relacionado à necessidade de diagnósticos mais rápidos, acessíveis e de baixo custo, especialmente em regiões com infraestrutura limitada. A partir de 2021, observa-se uma leve queda no número de publicações e essa redução pode estar relacionada ao redirecionamento de pesquisas devido aos impactos causados pela pandemia da COVID-19. Adicionalmente, desafios regulatórios e de implementação clínica podem ter contribuído para a diminuição observada da aplicação desses dispositivos em serviços de saúde (KIM et al., 2023).

Figura 8 - Anos e números de publicações em biossensores eletroquímicos e biossensores eletroquímicos para serviços de saúde.



Fonte: (YUNUS et al., 2023), adaptado.

Apesar deste estudo refletir o cenário daquele momento, sabe-se que grandes esforços têm sido empregados desde então em pesquisa básica e aplicada indo da síntese e caracterização de novos nanomateriais com potenciais aplicações nestes dispositivos, bem como redefinições de estratégias de ensaios, desenvolvimento de

novas plataformas e até mesmo integração com inteligência artificial e *machine learning* para melhorar a acurácia e a confiabilidade dos biossensores desenvolvidos e ajudar na tomada de decisão (BHAIYYA et al., 2024; OUYANG et al., 2024; WASILEWSKI; KAMYSZ; GĘBICKI, 2024).

Nesse sentido, as propriedades eletroquímicas associadas, como condutividade, corrente e impedância, podem ser utilizadas para monitorar de modo preciso interações entre biomoléculas de interesse (MAGAR; HASSAN; MULCHANDANI, 2021). E, entre das técnicas eletroquímicas, a espectroscopia de impedância eletroquímica é uma das mais utilizadas porque possibilita detectar pequenas variações no sistema investigado, tanto no que diz respeito a espécies condutoras quanto isolantes, e, ainda, permite a condução de medida em estado de equilíbrio. Adicionalmente, uma característica importante é que a espectroscopia de impedância eletroquímica é menos destrutiva quando comparada a outras técnicas eletroquímicas (BOGOMOLOVA et al., 2009; PRODROMIDIS, 2010).

3.1.1 Espectroscopia de impedância eletroquímica

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS, do inglês *Electrochemical Impedance Spectroscopy*), é uma técnica eletroquímica amplamente utilizada para investigação em uma série de sistemas, desde aqueles que envolvem processos de armazenamento de energia e corrosão, até os sensores e biossensores (BOGOMOLOVA et al., 2009; MAGAR; HASSAN; MULCHANDANI, 2021; PANCHAL et al., 2025; PRODROMIDIS, 2010), possibilitando explorar processos de transferência de massa, transferência eletrônica, processos cinéticos e difusionais (CARVALHO; ANDRADE; BUENO, 2006). Nesse sentido, a EIS mostra-se uma ferramenta poderosa para estudar propriedades eletrônicas intrínsecas dos materiais e, ainda, processos específicos que podem influenciar o comportamento eletroquímico do sistema investigado.

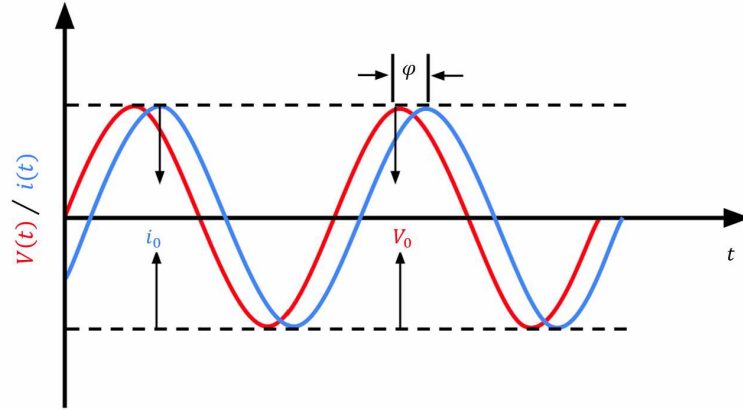
Sob ponto de vista mais fundamental, a impedância representa uma oposição ao fluxo de corrente em um circuito elétrico composto por elementos resistores, capacitores e indutores. Assim, se assumirmos uma perturbação suficientemente pequena, $V(t)$:

$$V(t) = V_0 \sin(\omega t) \quad (1)$$

a uma determinada frequência angular, ω , como resultado surge uma corrente elétrica, $i(t)$, na mesma frequência, porém com uma diferença de fase φ , **Figura 9**:

$$i(t) = i_0 \sin(\omega t + \varphi) \quad (2)$$

Figura 9 - Comportamento gráfico de uma perturbação aplicada, $V = V(t)$, e sua respectiva resposta, $i = i(t)$. As quantidades V_0 e i_0 representam a amplitude e φ o ângulo de defasagem.



Fonte: O autor (2025).

A impedância $Z(\omega)$ é dada por:

$$Z(\omega) = \frac{V(t)}{i(t)} \quad (3)$$

$$Z(\omega) = Z_0 \frac{\sin(\omega t)}{\sin(\omega t + \varphi)} \quad (4)$$

em que $Z_0 = V_0/i_0$ é definida como impedância inicial do sistema. Ainda, $Z(\omega)$ pode ser reescrita na forma:

$$\begin{aligned} Z(\omega) &= |Z|e^{j\varphi} = |Z|[\cos(\varphi) + j\sin(\varphi)] \\ Z(\omega) &= Z'(\omega) + jZ''(\omega) \end{aligned} \quad (5)$$

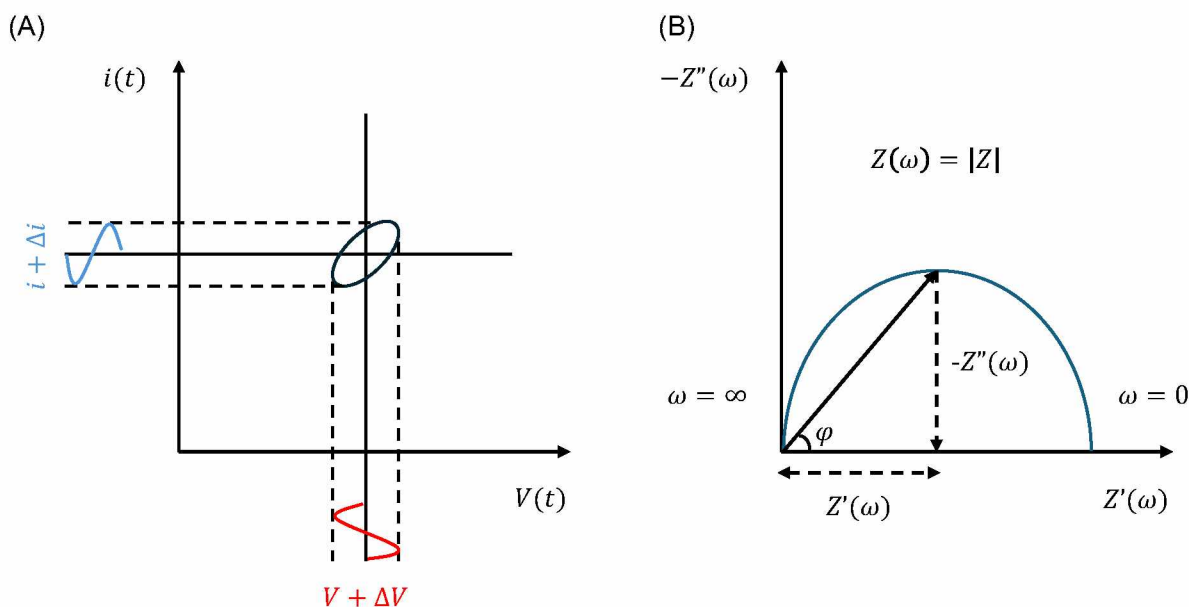
onde $j = \sqrt{-1}$, Z' e Z'' são as componentes real e imaginária da impedância que estão associadas à resistência ôhmica e a reatância, quer capacitiva ou indutiva, respectivamente. O módulo de $Z(\omega)$ e a diferença de fase φ , são dadas por:

$$|Z| = \sqrt{[Z'(\omega)]^2 + [Z''(\omega)]^2} \quad (6)$$

$$\varphi = \begin{cases} \arctan \left[\frac{Z''(\omega)}{Z'(\omega)} \right], & Z'(\omega) \geq 0 \\ \pi + \arctan \left[\frac{Z''(\omega)}{Z'(\omega)} \right], & Z'(\omega) < 0 \end{cases} \quad (7)$$

Se, para uma única frequência, for plotado o sinal de resposta, $i(t)$, em função da perturbação aplicada, $V(t)$, em um sistema cartesiano a figura formada é uma elipse, conhecida como curva de Lissajous, **Figura 10 (A)**, que representa a visualização da relação entre corrente e tensão no domínio do tempo para esta frequência específica. Ainda, a partir desta análise é possível construir a representação mais usual de uma medida de espectroscopia de impedância eletroquímica, o diagrama de Nyquist, **Figura 10 (B)**, onde é possível observar a evolução da impedância do sistema ao longo de uma ampla faixa de frequências.

Figura 10 - (A) Curva de Lissajous e (B) diagrama de Nyquist com vetor impedância.



Fonte: O autor (2025).

De modo geral a abordagem associada ao tratamento dos dados espectroscópicos obtidos é através da associação de um circuito elétrico equivalente que, na maioria das vezes, combinam elementos resistores e capacitores, para simular perdas ôhmicas e processos de acumulação de cargas, respectivamente e em outros casos também com elemento indutor para simular processos adsorptivos; em que a associação destes elementos possuem um correspondente análogo aos itens

constituintes de uma interface eletrodo/solução em uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos (LAZANAS; PRODROMIDIS, 2023).

Na **Figura 11** é apresentado os elementos que usualmente são considerados na modelagem do sistema eletroquímico. O resistor, R , representa a resistência ôhmica da solução eletrolítica e/ou do material condutor e sua impedância é constante e não depende da frequência. No diagrama de Nyquist, $-Z''$ versus Z' , é representado como um segmento horizontal. O capacitor, C , representa o comportamento capacitivo da dupla camada elétrica, C_{dl} , que está associada a interface eletrodo/solução e sua impedância é inversamente proporcional a frequência. Já o indutor, L , não é frequentemente observado em sistemas eletroquímicos, mas pode ser considerado caso o efeito de indutância seja percebido, bem como processos de difusão rápida. Sua impedância é diretamente proporcional à frequência. O elemento de Warburg, W , está associado a processos de difusão de massa no eletrólito ou propriamente no eletrodo. Sua impedância é proporcional a $1/\sqrt{\omega}$. No diagrama de Nyquist, aparece como uma reta inclinada a 45° em regiões de baixa frequência.

Figura 11 - Elementos, parâmetros e impedância associadas para simulação de dados de EIS.

Elemento	Parâmetro	Impedância Z
Resistor	R	$Z = R$
Capacitor	C	$X_C = 1/(j\omega C)$
Indutor	L	$X_L = j\omega L$
Warburg	W	$Z_W = 1/Q(j\omega)^{1/2}$
Elemento de fase constante	Q_0, n_0	$Z_{CPE} = 1/Q(j\omega)^{n_0}$

Fonte: O autor (2025).

Em relação ao elemento de fase constante, Q_0 e n_0 , o comportamento capacitivo de um sistema eletroquímico dificilmente poderá ser descrito por um capacitor ideal em virtude de a maior parte dos sistemas avaliados possuírem uma

distribuição de tempos de relaxação que são ocasionadas por heterogeneidades do eletrodo e essa distribuição de tempos característicos acaba inviabilizando a utilização de um capacitor ideal (REIS, 2017). Para tempos de relaxação normal, a impedância associada é dada por:

$$Z_{CPE} = \frac{1}{Q(j\omega)^n} \quad (8)$$

onde Q é um fator de proporcionalidade e n é um parâmetro que descreve a largura da distribuição de tempos de relaxação. As componentes real e imaginária de (8) são:

$$Z'_{CPE}(\omega) = \frac{\cos\left(\frac{n_0\pi}{2}\right)}{\omega^{n_0}Q_0} = \frac{a_0}{\omega^{n_0}Q_0} \quad (9)$$

$$-Z''_{CPE}(\omega) = \frac{\sin\left(\frac{n_0\pi}{2}\right)}{\omega^{n_0}Q_0} = \frac{b_0}{\omega^{n_0}Q_0} \quad (10)$$

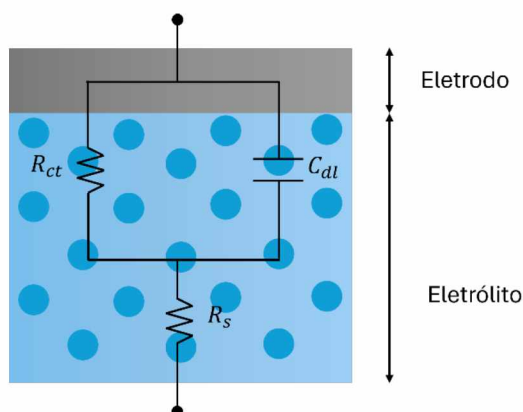
Nesse sentido, o CPE pode ser considerado uma generalização do capacitor ideal. A partir de (9) e (10) para $n_0 = 1$, a contribuição total da impedância é imaginária, como no caso do capacitor ideal. Agora, para valores de $n_0 < 1$, parte da impedância é real. Nisso, é possível observar que tanto n_0 quanto Q_0 não dependem da frequência, por isso é chamado de elemento de fase constante (REIS, 2017).

Uma opção muito utilizada para simular sistemas eletroquímicos é o circuito de Randles simplificado (ALAVI et al., 2017), **Figura 12**, consistindo essencialmente em três componentes elétricos: a resistência da solução, R_s , a capacitância da dupla camada elétrica, C_{dl} , e a resistência de transferência de carga entre o eletrodo e o eletrólito R_{ct} . No circuito de Randles simplificado, o comportamento da dupla camada elétrica é representado por um capacitor de placas paralelas e a resistência de transferência de carga que existe na interface entre eletrodo e solução é representado por um resistor. Devido à contribuição de processos faradaicos e capacitivos, o R_{ct} e C_{dl} são associados em paralelo. O efeito resistivo do transporte de íons na solução em virtude da corrente que atravessa a interface eletrodo/solução é representado por um resistor, R_s , denominado resistência de solução. Em processos eletroquímicos mais complexos, em que os efeitos de difusão são apreciáveis, esse circuito não modela os dados experimentais e nesse caso o sistema pode ser modelado a partir

da adição do elemento de Warburg, W (ALAVI et al., 2017; ORAZEM; ULGUT, 2024; REIS, 2017).

Considerando o conjunto de vantagens no uso da técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica, pode-se citar a possibilidade de realizar análises *in situ* e ter informações precisas do sistema estudado a uma determinada frequência. Devido a sua natureza dinâmica, a EIS torna possível a detecção de mudanças sutis que acontecem na interface do eletrodo/eletrolito (REIS, 2017). Portanto, a análise do comportamento de $i = i(t)$ permite a avaliação de processos de transporte de carga, pseudocapacitância e de dupla camada elétrica, bem como a obtenção de alguns parâmetros eletroquímicos, como resistência de transferência de carga e capacitância. No contexto dos biossensores, possibilita o monitoramento de interações biomoleculares a partir desses parâmetros (BRETT, 2022; HEINE et al., 2021; LAZANAS; PRODROMIDIS, 2023; PRODROMIDIS, 2010). Ainda, devido a sobreposição por um sinal senoidal com uma amplitude da ordem de 10^{-3} volts, torna-se possível uma investigação do sistema próximo ao estado estacionário, o que facilita a obtenção de parâmetros cinéticos e relacionados aos processos difusionais, a depender das características desta perturbação aplicada (LAZANAS; PRODROMIDIS, 2023).

Figura 12 - Representação esquemática de um circuito de Randles simplificado.



Fonte: O autor (2025).

Essas características são altamente relevantes para o desenvolvimento de biossensores do tipo impedimétricos, uma vez que a espectroscopia de impedância eletroquímica permite detectar variações sutis que ocorrem na interface

eletrodo/eletrólito. Essas variações são promovidas pela interação específica entre o biorreceptor imobilizado na superfície do eletrodo e o analito alvo que está presente na amostra. Essa sensibilidade é fundamental para aplicações que priorizem alta sensibilidade e precisão na detecção de biomoléculas, mesmo em concentrações extremamente baixas.

Ademais, a EIS oferece a vantagem de possibilitar medições *in situ*, ou seja, diretamente no ambiente de interesse, sem a necessidade de complexas etapas de preparação ou até mesmo extração de amostra. Por se tratar de uma técnica não invasiva, que preserva a integridade do sistema analisado, permite o monitoramento contínuo de processos interfaciais ao longo do tempo. Essa capacidade de acompanhar fenômenos dinâmicos sem comprometimento da estrutura e/ou funcionalidade do biossensor é especialmente valiosa em contextos biomédicos, ambientais e até mesmo industriais (BIGDELL et al., 2021).

4 POLÍMEROS CONDUTORES

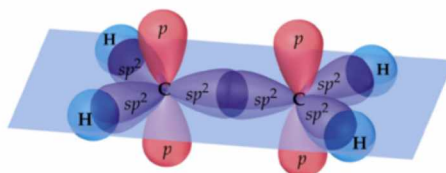
4.1 ESTRUTURA MOLECULAR ORGÂNICA

As bases moleculares da ciência de polímeros foram desenvolvidas a partir dos trabalhos pioneiros de Herman Staudinger, em 1920, com a formulação do conceito de macromoléculas e, após isso, estes materiais passaram a ser extensivamente estudados acabando por consolidar uma área de pesquisa com características próprias, propiciando um rápido desenvolvimento. Em meados de 1970, a partir dos trabalhos de Shirakawa e colaboradores foi que ocorreu um salto na pesquisa com materiais poliméricos condutores (DIAS; SILVA, 2012a).

Os polímeros condutores correspondem a uma classe de materiais em que estruturalmente são conjugados. Estes materiais se caracterizam em sua grande maioria, por uma estrutura molecular plana. Considerando os três possíveis estados de hibridização para o átomo de carbono, unidade esta majoritária nestes tipos de materiais: sp^3 , sp^2 e sp ; estes orbitais estão envolvidos na formação da ligação do tipo σ e π . Em geral, o comprimento da conjugação, interação intra e inter cadeia e a extensão da desordem são alguns dos parâmetros importantes que conferem a esses materiais propriedades físicas de interesse e por isso têm sido extensivamente estudados (DIAS; SILVA, 2012a; GUO; FACCHETTI, 2020; NAMSHEER; ROUT, 2021; OUYANG, 2021; SHARMA et al., 2021).

A sobreposição dos orbitais sp^2+2p_z descreve a estrutura eletrônica dos polímeros condutores. A interpenetração frontal dos orbitais híbridos sp^2 dá origem a ligação do tipo σ que une os átomos de carbono à cadeia polimérica principal, caracterizando uma ligação fortemente localizada. Os orbitais puros $2p_z$ sofrem uma atração de eixos paralelos dando origem a ligação π , mais deslocalizada (DIAS; SILVAa, 2012; SCOTT, 2010), **Figura 13**.

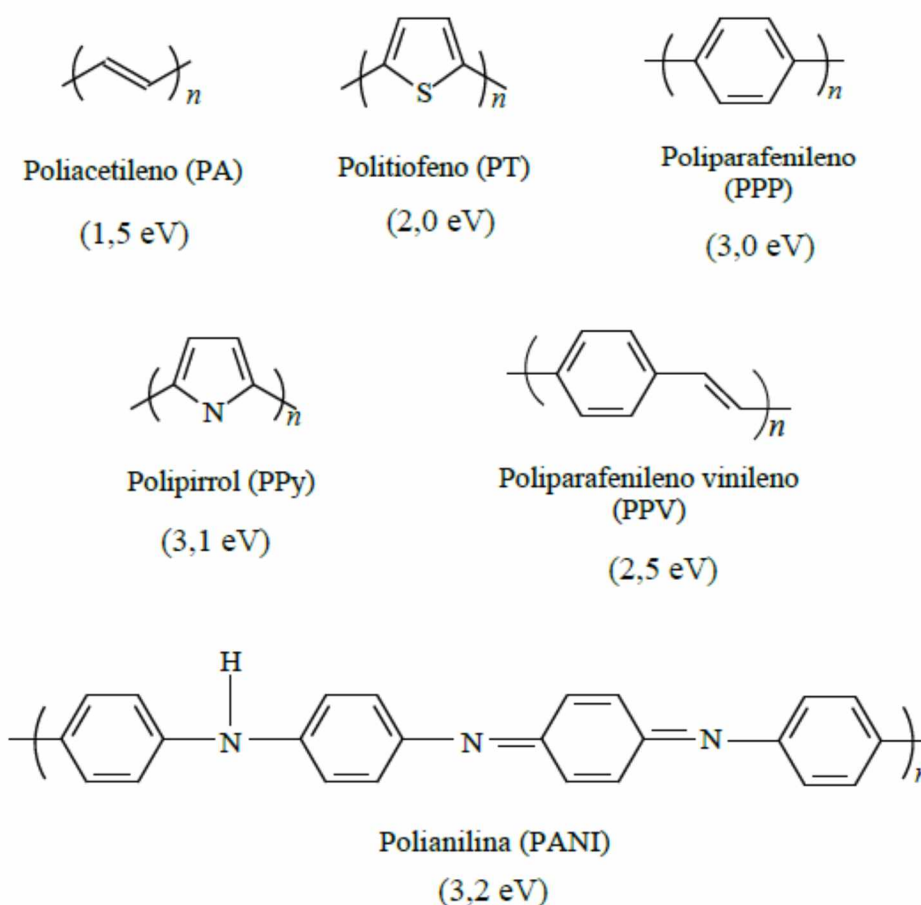
Figura 13 - Formação da ligação σ e π no átomo de carbono.



Fonte: (BROWN; LEMAY JR; BURSTEN, 2003), adaptado.

A interação entre os orbitais $2p_z$ induz a formação de orbitais ocupados do tipo π e dos desocupados do tipo π^* , que se abrem obedecendo à instabilidade de Peierls. Essa instabilidade faz com que esses orbitais apresentem características semelhantes às bandas de valência e condução como nos semicondutores inorgânicos. O orbital de mais alta energia ocupada é denominado HOMO (do inglês *Highest Occupied Molecular Orbital*), π , e o orbital de mais baixa energia desocupada, π^* , é denominado LUMO (do inglês *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*). A diferença de energia entre os orbitais HOMO e LUMO caracteriza um *gap*, que varia, de modo geral entre 1,5 e 3,2 eV, **Figura 14**, fornecendo a esses materiais propriedades de transporte eletrônico importantes e comparáveis aos semicondutores inorgânicos (DIAS; SILVA, 2012a; KIEBOOMS; MENON; LEE, 2001; SCOTT, 2010).

Figura 14 - Nomes, fórmulas estruturais e valores de *gap* de alguns polímeros condutores.



Fonte: O autor (2025).

Apesar da teoria do orbital molecular (MOT, do inglês *Molecular Orbital Theory*) ser um modelo fundamental que descreve a formação de ligações químicas

em moléculas discretas e bem definidas, sua aplicação em polímeros condutores, estruturas macromoleculares estendidas, possui algumas limitações. A MOT não consegue explicar completamente a condutividade desses materiais porque ela não considera de modo adequado os efeitos de desordem estrutural de rede, dopagem e os mecanismos de transporte eletrônico. Nos polímeros condutores, a presença de irregularidades na cadeia, conformação e defeitos estruturais afetam diretamente a mobilidade dos portadores de carga. Além disso, o processo de dopagem modifica a distribuição eletrônica, o que a teoria do orbital molecular apresenta limitação conceitual, e isso sugere que o modelo de estrutura de bandas seja o mais adequado para descrever as propriedades eletrônicas desses tipos de materiais (HAZELTON; YE; CHEN, 2023; POOJA et al., 2023; SHOJAEI; ROSTAMI-TAPEH-ESMAEIL; MIGHRI, 2024).

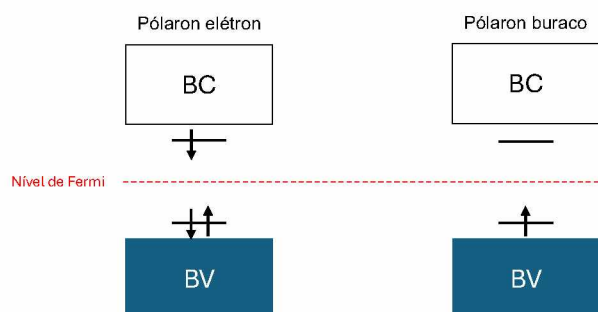
4.2 ESTRUTURA ELETRÔNICA DE POLÍMEROS CONDUTORES

Os polímeros condutores apresentam sequências planares e/ou quase planares de ligações simples e duplas alternadas ao longo de sua cadeia, **Figura 14**. Neste caso, a condutividade eletrônica é resultado da mobilidade dos portadores de carga introduzidos no sistema conjugado através de um processo de dopagem. Este processo ocorre quando a cadeia polimérica sofre oxidação ou redução, dopagem do tipo-*p* e tipo-*n*, respectivamente, em analogia de como ocorre nos semicondutores inorgânicos (DIAS; SILVA, 2012b). Entretanto, diferentemente dos semicondutores inorgânicos, no polímero condutor é energeticamente mais favorável localizar a carga e fazer uma relaxação de rede na vizinhança desta carga, fazendo com que surja deformações e defeitos de carga localizados que são responsáveis pela condutividade nestes materiais. Este processo induz o aparecimento de estados eletrônicos no *gap* entre as bandas de valência e condução, estado este associado a formação de quase-partículas: pólarons e bipólarons; com exceção para o poliacetileno, que envolve a formação de uma quase-partícula chamada sóliton (BREDAS; STREET, 1985).

Em seu estado excitado, uma molécula é chamada de radical íon ou pólaron que, ao sofrer oxidação, passa a ser denominada radical cátion ou pólaron buraco, e se sofrer redução, é denominada radical ânion ou pólaron elétron. Os pólarons possuem *spin* igual a 1/2 e são formados pelo conjunto de carga e deformação de

rede dando origem a estados eletrônicos com energias bem definidas no *gap* e que podem ser observadas por transição óptica (DIAS; SILVA, 2012b), **Figura 15**.

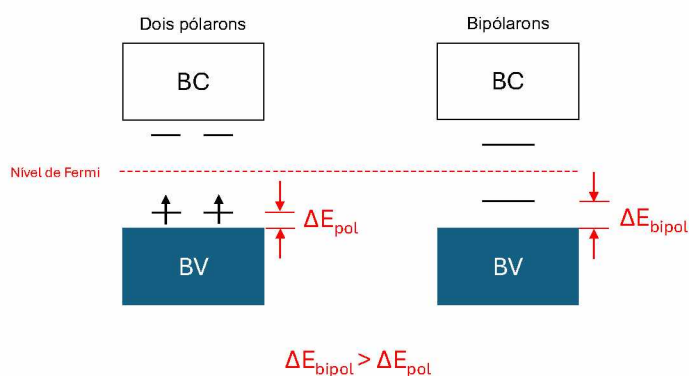
Figura 15 - Diagrama esquemático para estrutura de bandas de uma quase-partícula do tipo pólaron: elétron e buraco.



Fonte: O autor (2025).

Ainda, um segundo elétron pode ser retirado da cadeia polimérica e essa retirada leva a duas situações possíveis: (i) surgimento de mais um pólaron ou do pólaron existente e (ii) a formação de um bipólaron. O bipólaron é definido como um par de cargas similares, com *spin* igual a 0. Energeticamente, a formação do estado bipólaron é favorecida em relação a formação de dois pólarons uma vez que a interação eletrostática entre as duas cargas é maior que a repulsão coulombiana que existe entre duas cargas de mesmo sinal que estão confinadas no mesmo espaço (BREDAS; STREET, 1985; DIAS; SILVA, 2012b). Na **Figura 16** é apresentada uma representação esquemática da estrutura de bandas para um estado eletrônico com dois pólarons e com um bipólaron.

Figura 16 - Diagrama esquemático da representação de uma quase-partícula do tipo: dois pólarons e bipólarons.



Fonte: o autor (2025).

Os pólarons e bipólarons podem se mover ao longo de toda a cadeia polimérica induzindo mudanças geométricas localizadas na rede e, por isso, são considerados portadores de carga e responsáveis por conferir a estes materiais um caráter metálico (BREDAS; STREET, 1985).

4.3 POLIPIRROL

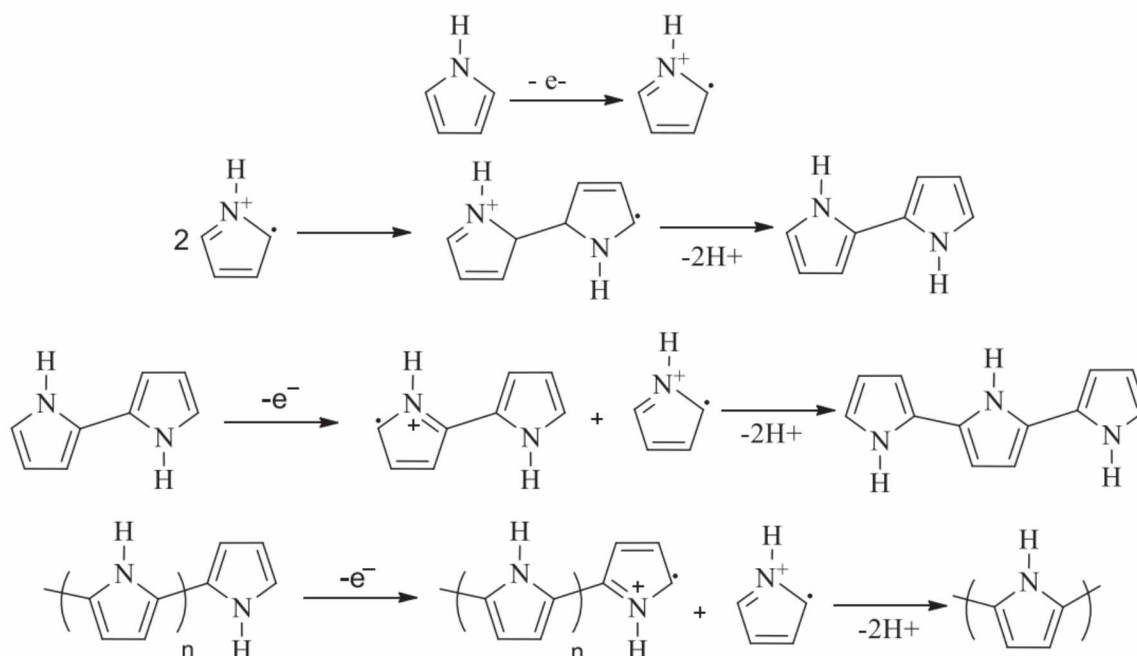
O polipirrol (PPy, do inglês *polypyrrole*) é um homopolímero orgânico de cadeia heterogênea formado pela polimerização oxidativa do monômero pirrol (Py, do inglês *pyrrole*). Um dos primeiros relatos do PPy foi feito em 1963 por McNeill e colaboradores em uma série de trabalhos sobre estrutura química e eletrônica de polipirróis (BOLTO; MCNEILL; WEISS, 1963; BOLTO; WEISS, 1963; MCNEILL et al., 1963; MCNEILL; WEISS; WILLIS, 1965).

A síntese do polipirrol é conduzida a partir da oxidação química ou eletroquímica do monômero pirrol, onde ocorre a formação de radicais cátions e, por conseguinte, seus acoplamentos dando origem a oligômeros e, por fim, ao polímero. Tanto a síntese química, quanto a eletroquímica, a depender do tipo de aplicação podem ser consideradas. A síntese química é uma opção interessante sob o ponto de vista em larga escala (MORÁVKOVÁ et al., 2021; PANG; ARSAD; AHMADIPOUR, 2021), por outro lado a eletroquímica é a opção mais atrativa se o objetivo for a formação de filmes finos, o que possibilita controle sobre a espessura, sendo amplamente utilizada na modificação de eletrodos para uma vasta gama de aplicações (PANG; ARSAD; AHMADIPOUR, 2021; RAHMAN KHAN; RUMON, 2024).

Sob o ponto de vista eletroquímico, o mecanismo de síntese mais bem aceito para a formação do polipirrol é apresentado na **Figura 17**. De acordo com o mecanismo proposto por Genis, Bidan e Diaz (GENIES; BIDAN; DIAZ, 1983); inicialmente, o monômero sofre a oxidação dando origem a radicais cátions altamente reativos. Esses radicais tendem a acoplar-se, gerando dímeros que, ao perderem prótons, estabilizam suas ligações. Como é energeticamente mais favorável remover elétrons dos dímeros formados do que dos monômeros isolados, essas espécies são prontamente oxidadas, permitindo seu acoplamento com outros radicais de pirrol e a consequente formação de oligômeros. Esse processo de oxidação, acoplamento e desprotonação se repete sucessivamente até que a cadeia do oligômero atinja um tamanho crítico, momento em que se torna insolúvel e começa a precipitar na

superfície do eletrodo. A partir desse ponto, o crescimento do polímero continua na superfície do eletrodo, formando uma estrutura condutora que vai se expandindo progressivamente conforme novas unidades de pirrol são incorporadas ao material depositado (HRYNIEWICZ, 2022).

Figura 17 - Mecanismo de eletropolimerização do pirrol.



Fonte: (GENIES; BIDAN; DIAZ, 1983), adaptado.

Os valores de condutividade elétrica para o PPy variam de acordo com o método de síntese, quer química ou eletroquímica, dopagem e proposta de aplicação, contudo, meios reacionais iônicos têm mostrado um relativo aumento nesta propriedade, levando a valores entre 10^{-9} e 10^2 S cm^{-1} (AHMAD et al., 2020; POOJA et al., 2023a) fazendo com que o PPy seja um dos polímeros condutores mais extensivamente explorados. Ainda, é importante mencionar que, por possuir comportamento biocompatível, é uma opção interessante em aplicações que envolvam biossensoriamento. Corroborando com sua biocompatibilidade, o PPy, bem como os polímeros da classe, acaba por sofrer reações de oxirredução intrinsecamente, portanto, apresenta comportamento eletroativo em solução tampão fosfato salino (PBS, do inglês *phosphate-buffered saline*), pH 7,4, dispensando o uso

de sondas eletroquímicas para avaliar processos redox em sua interface, facilitando sua aplicação (BEREGOI et al., 2022; DUTTA et al., 2022; LIU et al., 2025).

Nesse sentido, desde sua descoberta, extensivas pesquisas têm sido realizadas com polímeros condutores, tanto no que diz respeito a novas estratégias de síntese e caracterização desses materiais quanto a aplicações em diferentes campos da eletroquímica, como eletrocatalise, em dispositivos de armazenamento de energia, fotovoltaicos, sensores e biossensores. Pesqueira e colaboradores (2022) (PESQUEIRA et al., 2022), modificaram um eletrodo baseado em grafite a partir da deposição eletroquímica do PPy e incorporaram nanopartículas de ouro em sua superfície para avaliação da atividade oxidativa do ácido ascórbico. Hryniewicz, Gil e Vidotti (2022) (HRYNIEWICZ; GIL; VIDOTTI, 2022), sintetizaram nanotubos de polipirrol decorados com AuNPs, PPy-NTs-AuNPs, para desenvolvimento de um supercapacitor de estado sólido. Deller et al. (2023) (DELLER et al., 2023), avaliaram um material compósito a partir do polímero PEDOT:PSS com nanopartículas de ouro ancoradas para detecção de um pesticida, Primicarb. Hryniewicz e colaboradores (2022) (HRYNIEWICZ et al., 2022), modificaram eletrodos de malha de aço a partir da síntese eletroquímica de nanoestruturas de PPy:PPS-AuNPs e PPy-NTs-AuNPs para aplicação no diagnóstico sorológico da COVID-19.

Adicionalmente, os polímeros condutores têm sido uma opção interessante para modificação de eletrodos devido suas propriedades como alta condutividade elétrica, estabilidade e facilidade de síntese e dopagem em substituição aos materiais convencionais condutores e semicondutores metálicos (LANZALACO; MOLINA, 2020; PAN et al., 2022).

Um fator limitante no desenvolvimento e aplicação dessa classe de materiais é a baixa estabilidade mecânica devido ao processo de entumescimento e encolhimento resultante de processos faradaicos, uma vez que ocorrem alterações de volume na matriz polimérica e, tais mudanças estruturais, podem comprometer a integridade física do material que pode reduzir a durabilidade em dispositivos eletroquímicos. Além disso, muitos polímeros possuem uma área superficial eletroativa relativamente baixa, o que acaba limitando a densidade de sítios disponíveis para interação com espécies química e/ou biológica de interesse, impactando negativamente o seu emprego em aplicações do tipo sensores, biossensores, atuadores e dispositivos de armazenamento de energia (SCOTT,

2010). Desse modo, uma estratégia amplamente utilizada em aplicações tecnológicas é a incorporação de nanopartículas metálicas (NPs, do inglês *nanoparticles*) à estrutura polimérica. Entre as NPs, as nanopartículas de ouro (AuNPs, do inglês *gold nanoparticles*) têm se destacado devido suas propriedades físico-químicas únicas, como elevada condutividade elétrica, excelente biocompatibilidade, estabilidade química e capacidade de formação de interfaces eficientes com materiais orgânicos.

A associação de AuNPs aos polímeros condutores promove uma série de melhorias estruturais e funcionais ao nanomaterial compósito obtido. Na matriz, as nanopartículas de ouro atuam como centros de nucleação favorecendo a organização da cadeia polimérica e contribuindo para uma melhor conectividade eletrônica entre os domínios condutores. Ainda, a presença das AuNPs aumenta significativamente a área superficial eletroativa do nanocompósito, ampliando a interface disponível para reações eletroquímicas e interações moleculares devido a uma maior densidade de carga e, conseqüentemente, uma melhoria expressiva nas propriedades elétricas do material (DE MATTEIS et al., 2021).

Além disso, as AuNPs atuam como mediadores de transferência de carga, facilitando o transporte eletrônico entre diferentes regiões da matriz polimérica e reduzindo barreiras energéticas que normalmente dificultariam a mobilidade dos portadores de carga, ainda que sejam polímeros condutores. Como efeito desta associação, o nanocompósito obtido apresenta desempenho superior em termos de condutividade elétrica, estabilidade mecânica e melhor resposta eletroquímica quando comparados apenas ao polímero (DELLER et al., 2023; HRYNIEWICZ et al., 2022; HRYNIEWICZ; GIL; VIDOTTI, 2022).

A associação de não apenas as AuNPs aos polímeros condutores têm representado uma abordagem híbrida e tem sido extensivamente explorada em uma série de aplicações como biossensores, células solares orgânicas, supercapacitores e sistema de liberação controlada de fármacos (JALENDRA; TAMTA; KUMAR, 2025; RIBEIRO; DIAS; ZILLE, 2022) .

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de um imunossensor impedimétrico baseado em materiais nanoestruturados de polímero condutor polipirrol (PPy) e nanopartículas de ouro (AuNPs) eletrodepositados sobre eletrodos de malha de aço para imobilização de proteínas recombinantes de *Leishmania infantum* como estratégia para o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Modificação de eletrodos descartáveis de malha de aço a partir da síntese eletroquímica do PPy:PSS e incorporação das AuNPs;
- ii. Caracterização química e física dos eletrodos modificados (PPy:PSS e PPy:PSS-AuNPs) através das técnicas de voltametria cíclica (VC), espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS) e microscopia eletrônica de transmissão (MET);
- iii. Avaliação da formação de uma monocamada auto-organizada (SAM) a partir da ligação do ácido 3-mercaptopropiônico (3-MPA) sobre PPy:PSS-AuNPs para ligação das proteínas recombinantes K39 e C1;
- iv. Validação dos imunossensores impedimétricos desenvolvidos a partir da detecção de anticorpos purificados monoclonais para proteína recombinante K39 e policlonais a partir da proteína recombinante C1;
- v. Aplicação dos imunossensores impedimétricos para detecção de anticorpos em amostras reais (soros caninos com diagnóstico positivo e negativo para a leishmaniose visceral).

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 REAGENTES, SOLUÇÕES E MATERIAIS

Os reagentes de grau analíticos utilizados no desenvolvimento deste projeto de doutoramento são listados a seguir: pirrol (PPy), poli(4-estirenosulfonato de sódio) (NaPSS), ácido tetracloroáurico (III) tri-hidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), ácido 3-mercaptopropiônico (3-MPA), N-(3-dimetilaminopropil)-n-etilcarbodiimida (EDC), N-hidroxissuccinimida (NHS) e hidrocloreto de 2-aminoetanol foram obtidos na Sigma-Aldrich (Missouri, Estados Unidos). O cloreto de potássio (KCl), sulfito de sódio (Na_2SO_3), sódio fosfato dibásico anidro (Na_2HPO_4), potássio fosfato dibásico (K_2HPO_4), fosfato potássio monobásico (KH_2PO_4), cloreto de sódio (NaCl), ferricianeto de potássio [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] e hidróxido de sódio (NaOH) foram obtidos na LabSynth (São Paulo, Brasil). O etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$), isopropanol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$) e acetona ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$) foram obtidos na Biotec (São Paulo, Brasil).

A solução de monômero pirrol utilizada foi previamente purificada por meio de destilação simples, aliqotada e armazenada em frasco âmbar mantido no congelador para evitar oxidação casual. Então, o meio reacional para eletrossíntese do PPy foi preparado a partir de Py 50 mmol L^{-1} e 14 g L^{-1} de NaPSS. A solução de ouro utilizada foi preparada a partir de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, K_2HPO_4 $1,7 \cdot 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$, Na_2SO_3 $3,6 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e EDTA $4,8 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, adicionados respectivamente nesta ordem para evitar precipitação. Ainda, foi realizado ajuste de pH para 8 por adição de KOH 1 mol L^{-1} . A solução tampão fosfato salino PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4 foi preparada a partir de KH_2PO_4 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, Na_2HPO_4 $1,0 \cdot 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ e KCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ com ajuste de pH para 7,4 por adição de NaOH 1 mol L^{-1} . A solução de formação de monocamada auto-organizada foi preparada a partir de 3-MPA $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Todas as soluções aquosas foram preparadas utilizando água ultrapura, $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$.

Neste trabalho as modificações do eletrodo foram feitas a partir da malha de aço 316 e 400 *mesh*.

6.2 AMOSTRAS BIOLÓGICAS

6.2.1 Pares antígeno-anticorpo

A proteína recombinante K39, antígeno, de *Leishmania donovani* foi expressa em *Escherichia coli* e utilizada como elemento de reconhecimento dos imunossensores. A imunoglobulina específica dessa proteína usada na fase de detecção foi o anticorpo monoclonal, mAb-K39, obtido a partir de camundongos. Esse par: K39-mAb-K39; foi sintetizado pela *Imuny Biotechnology* (Campinas, São Paulo).

A proteína recombinante C1, $M_w = 40,7 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$, foi produzida através da tecnologia do DNA recombinante, sendo adquirida através de colaboração com o Laboratório de Leishmanioses do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os anticorpos específicos dessa proteína, anti-C1, foram produzidos pela imunização de soros de coelhos da raça Nova Zelândia, através da inoculação da proteína C1. Após imunização, as amostras foram centrifugadas e os soros obtidos purificados por cromatografia de afinidade em relação às proteínas G e A. Em seguida, os ensaios de ELISA foram realizados utilizando a proteína C1 para a determinação da concentração molar de IgGs específicas para esta proteína, obtendo-se uma concentração purificada de $1,40 \text{ mg mL}^{-1}$, $9,59 \text{ mmol L}^{-1}$ e $\text{IgG} = 146 \text{ kDa}$. As amostras contendo diferentes concentrações de IgGs anti-C1, $1,00$ a 200 nmol L^{-1} , foram obtidas por dissolução destes anticorpos em solução tampão fosfato salino PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4.

6.2.2 Soros caninos

Amostras de soros positivos para LVC foram coletadas de cães naturalmente infectados com o antígeno *L. infantum* em regiões endêmicas da cidade de Belo Horizonte (MG), Brasil. Para estas amostras, os diagnósticos foram realizados pelos métodos sorológicos IFAT e ELISA no Laboratório de Leishmanioses da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte (MG), Brasil. Para os controles negativos, amostras de soros foram obtidas a partir de cães saudáveis alojados em áreas não endêmicas da região metropolitana de Belo Horizonte. Todos os procedimentos experimentais envolvendo cães foram realizados de acordo com a prática animal definida pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da

Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo número 198/2014). Este protocolo seguiu as diretrizes do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal), o máximo comitê de ética do Brasil.

6.3 EQUIPAMENTOS E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DE MEDIDAS

Para caracterização da etapa elementar do substrato que compreende as modificações com as nanoestruturas de PPy:PSS e PPy:PSS-AuNPs, os eletrodos modificados foram submetidos às medidas de voltametria cíclica (VC), espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS) e microscopia eletrônica de transmissão (MET).

As medidas eletroquímicas, CV e EIS, foram realizadas utilizando o potenciostato Metrohm DropSens STAT-i-400, em célula eletroquímica convencional de três eletrodos contendo: eletrodo auxiliar de fio de platina, eletrodo de referência de Ag/AgCl/KCl_{sat} e eletrodo de trabalho consistindo no eletrodo modificado por PPy:PSS e PPy:PSS-AuNPs; em solução tampão fosfato salino 0,1 mol L⁻¹ pH 7,4. Para voltametria cíclica, as medidas foram conduzidas em uma velocidade de 20 mV s⁻¹, na faixa de potencial de -0,7 a +0,5 V. Já as medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica foram conduzidas a partir da aplicação de um potencial alternado de amplitude 10 mV, em circuito aberto, no intervalo de frequências de 10.000 Hz a 0,01 Hz e 10 pontos por década. Essas medidas foram realizadas parcialmente nos Laboratório de Espectrometria, Sensores e Biossensores (LaESB) e no Grupo de Pesquisa em Macromoléculas e Interfaces (GPMIn). Os dados espectrais de impedância foram tratados e estimados utilizando o software DropView 8400 a partir da modelagem de circuitos equivalentes, com valores de erros associados para cada parâmetro menores que 10%.

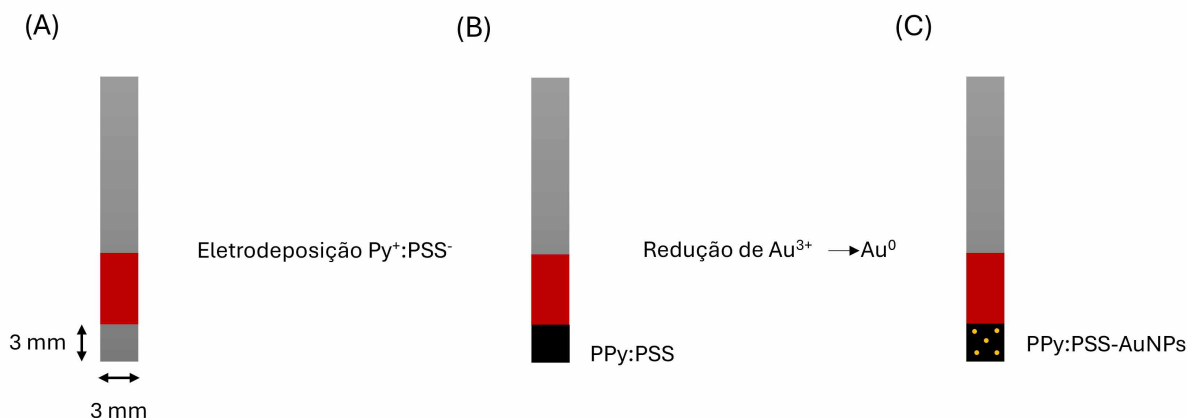
As medidas de MEV e EDS foram realizadas no equipamento Tescan Vega 3 LMU, com detector para EDS tipo SDD de 80 mm², imobilizadas sobre suporte do microscópio utilizando fitas de cobre. Para as medidas de MET, as amostras foram depositadas sobre um *grid* hexagonal de diâmetro 3 mm, 200 *mesh*. Ambas as medidas foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica (CME), laboratório de multiusuários da UFPR.

6.4 ELETRODEPOSIÇÃO

6.4.1 Polipirrol e nanopartículas metálicas de ouro

O eletrodo de malha de aço com área individual delimitada de $9,0 \text{ mm}^2$, **Figura 18**, foi conduzido ao processo de lavagem em banho ultrassônico na presença de solução alcoólica de etanol P.A. durante 10 min. Após, o eletrodo foi secado ao ar e em temperatura ambiente local, aproximadamente 25°C . A partir disso, o processo de eletrodeposição foi realizado com a imersão do eletrodo, previamente tratado, em solução aquosa eletrolítica contendo 50 mmol L^{-1} do monômero pirrol e 14 g L^{-1} de NaPSS, com controle de densidade de carga de 800 mC cm^{-2} a um potencial de $+0,8 \text{ V}$, em uma célula eletroquímica convencional composta por 3 eletrodos: 1 eletrodo de referência de $\text{Ag/AgCl}_{\text{sat.}}$, 1 eletrodo auxiliar de fio platina e o eletrodo de malha de aço como eletrodo de trabalho. Após eletrodeposição do PPy:PSS, o eletrodo então foi lavado por sua imersão em vial contendo $150 \mu\text{L}$ de água ultrapura por 1 min e seco em jato de nitrogênio por 30 segundos. Após, o eletrodo foi submetido a voltametria cíclica de forma a estabilizar o filme fino formado e posterior caracterização por impedância eletroquímica (EIS).

Figura 18 - Representação esquemática do (A) eletrodo de malha de aço e etapas de modificação a partir da eletrodeposição do (B) pirrol para formação do PPy:PSS e (C) incorporação de nanopartículas metálicas de ouro para obtenção do filme PPy:PSS-AuNPs. As nanoestruturas de ouro que compõem a figura na parte (C) não estão em escala e a disposição tem o intuito de apenas uma melhor compreensão visual da estratégia.



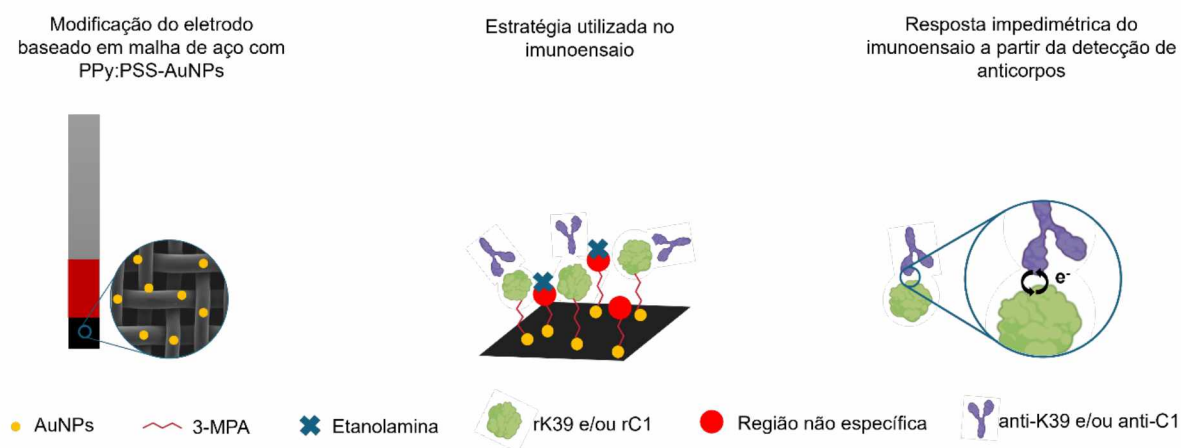
Fonte: O autor (2025).

Para incorporação das nanopartículas metálicas de ouro sobre o eletrodo modificado com PPy:PSS, este mesmo eletrodo foi imerso em uma solução aquosa contendo $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $1,7 \cdot 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ de K_2HPO_4 , $3,6 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de Na_2SO_3 e $4,8 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de EDTA, com ajuste para pH 8 a partir da adição de $\text{KOH } 1 \text{ mol L}^{-1}$. Os respectivos reagentes foram adicionados nessa ordem para evitar a precipitação do ouro. A eletrodeposição se deu com controle de densidade de carga de 300 mC cm^{-2} , a um potencial de $-1,1 \text{ V}$ para redução das espécies de Au^{3+} sobre o filme, gerando Au^0 metálico. Do mesmo modo que para o eletrodo já com o filme de PPy:PSS depositado, o com PPy:PSS-AuNPs também foi lavado por imersão em vial contendo $150 \mu\text{L}$ de água ultrapura por 1 min e seco em jato de nitrogênio por 30 segundos submetido, seguindo para voltametria cíclica de ordem a manter estabilidade do filme, bem como sua posterior caracterização por espectroscopia de impedância eletroquímica.

6.5 BIOFUNCIONALIZAÇÃO DAS PLATAFORMAS DESENVOLVIDAS PARA CONSTRUÇÃO DOS BIOSSENSORES

As etapas envolvidas no processo de biofuncionalização do eletrodo de malha de aço modificado com PPy:PSS-AuNPs para obtenção dos imunossensores impedimétricos neste trabalho são apresentadas esquematicamente na **Figura 19**.

Figura 19 - Representação esquemática da estratégia utilizada para construção dos imunossensores impedimétricos baseados na plataforma nanoestruturada desenvolvida (PPy:PSS-AuNPs). As estruturas que compõem a figura não estão em escala e a disposição tem o intuito de apenas uma melhor compreensão visual da estratégia.



Fonte: O autor (2025).

As etapas realizadas para a construção do imunossensor para detecção de anticorpos monoclonais contra a proteína recombinante K39 e a detecção de anticorpos policlonais contra a proteína C1, bem como seu emprego na detecção de anticorpos em amostras reais de soros caninos positivos, são compreendidas por:

1. Eletrodeposição dos filmes de PPy:PSS sobre malha de aço e posterior incorporação das AuNPs para obtenção do PPy:PSS-AuNPs;
2. Formação de uma monocamada auto-organizada a partir da imersão *overnight* do eletrodo funcionalizado em 75 μL de solução aquosa de ácido 3-mercaptopropiônico 1,0 mmol L^{-1} . Após, os eletrodos foram conduzidos a um processo de lavagem por sua imersão em vial contendo 150 μL de água ultrapura por 5 min e secos em jato de nitrogênio por 15 segundos, para então seguirem à etapa de ativação;
3. Ativação dos grupamentos funcionais da monocamada realizada pela imersão dos eletrodos, durante 20 minutos, em 75 μL de solução aquosa contendo os agentes de *cross-linking* EDC/NHS 10:15 mmol L^{-1} (v/v). Nesta etapa, os grupos carboxílicos terminais presentes na estrutura do ácido 3-mercaptopropiônico são ativados em NH-ésteres reativos para posterior ligação das proteínas recombinantes K39 e C1. Após, os eletrodos são lavados por imersão em vial contendo 150 μL de água ultrapura por 2 min e, em seguida, secos em jato de nitrogênio por 15 segundos;
4. Imobilização do biorreceptor através da imersão dos eletrodos previamente preparados em vial contendo 30 μL de solução aquosa das proteínas recombinantes K39 e C1, cada uma na concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, durante 60 minutos. Essas soluções foram preparadas a partir da diluição da solução estoque em tampão fosfato salino 0,1 mol L^{-1} pH 7,4. Após biofuncionalização, os eletrodos foram submetidos à lavagem em PBS 0,1 mol L^{-1} pH 7,4, a partir da dispensa de 150 μL de solução na parte isolante do eletrodo e deixado escorrer, sendo realizado em ambos os lados. Após, as plataformas foram secas em jato de nitrogênio por 15 segundos;

5. Bloqueio dos sítios reativos remanescentes através da imersão do eletrodo biofuncionalizado em vial contendo 75 μL de solução de etanolamina 100 mmol L^{-1} , recém preparada em PBS 0,1 mol L^{-1} pH 7,4, por 10 min. Após, eletrodos foram submetidos à lavagem em PBS 0,1 mol L^{-1} pH 7,4, a partir da dispensa de 150 μL de solução na parte isolante do eletrodo e deixado escorrer, sendo secados em jato de nitrogênio por 15 segundos;
6. Aplicação de cada biossensor desenvolvido, um com a proteína K39 e outro com a proteína C1, para detecção dos anticorpos anti-K39 e anti-C1, respectivamente. Nesta etapa, os eletrodos foram imersos em vial contendo 30 μL de solução de anticorpo monoclonal anti-K39 e policlonal anti-C1 durante 30 min. Foi avaliada a detecção para diferentes concentrações dos anticorpos. Após reação com cada concentração, C_i , do anticorpo, cada eletrodo foi lavado em solução tampão fosfato salino 0,1 mol L^{-1} pH 7,4 com a dispensa de 150 μL de solução na parte isolante do eletrodo e deixado escorrer, em ambos os lados, e lavados para secar em jato de nitrogênio por 15 segundos.

Todas as etapas de funcionalização dos eletrodos de malha de aço modificados com PPy:PSS-AuNPs foram realizadas em temperatura ambiente, para evitar variações na cinética de reação das etapas acima descritas. Para cada uma das etapas relacionadas à construção do imunossensor, desde a etapa elementar até a detecção dos anticorpos, inicialmente foram realizadas caracterizações voltamétricas e impedimétricas em solução tampão fosfato salino 0,1 mol L^{-1} pH 7,4. Para a detecção em amostras reais de soros caninos dos grupos positivo e negativo para a leishmaniose visceral, a última etapa de detecção foi modificada com o intuito de otimizar e obter um menor tempo de detecção. Para as medidas de impedância eletroquímica, o intervalo de frequência foi ajustado para 10.000 a 0,1 Hz com 36 pontos por espectro. Neste caso, o *pool* positivo ($n = 5$) e negativo ($n = 5$) foi diluído a partir da solução estoque nos fatores de diluição de 1:10, 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 e 1:1600, sendo preparados em PBS 0,1 mol L^{-1} pH 7,4.

7 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

7.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO PPy:PSS E PPy:PSS-AUNPS

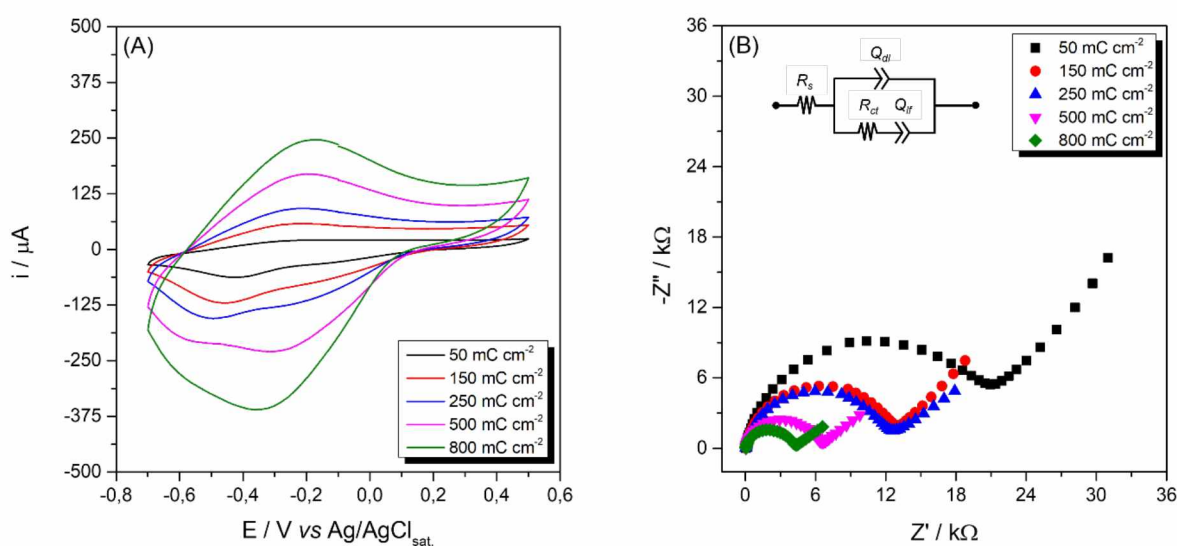
7.1.1 Estudo de diferentes densidades de carga de deposição para formação de PPy:PSS

Inicialmente, de ordem a compreender as melhores condições para eletrodeposição do PPy:PSS sobre eletrodo de malha de aço a partir de uma densidade de carga que melhor favoreça os processos redox intrínsecos do polímero, foi realizado um estudo de diferentes valores de densidades de carga para o PPy:PSS. Nesse sentido, a escolha do método de eletropolimerização é importante porque ele estará diretamente ligado com as propriedades do material sintetizado. Portanto, o método potenciostático de deposição foi o escolhido para produzir filmes com maior reatividade eletroquímica em comparação aos métodos de deposição galvanostático ou até mesmo por voltametria cíclica (MARTINS et al., 2008), além de possibilitar um controle sobre o processo de crescimento do filme polimérico, resultando em um material com estrutura mais ordenada. Desse modo, a cronoamperometria foi utilizada como método de síntese, em que os valores de densidade de carga, σ_c , avaliados foram de 50, 150, 250, 500 e 800 mC cm⁻². Após a modificação com cada uma das densidades de carga, os eletrodos foram caracterizados por voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica, **Figura 20**.

A voltametria cíclica foi realizada na faixa de potencial de -0,7 a +0,5 V com velocidade de varredura de 20 mV s⁻¹. A espectroscopia de impedância eletroquímica foi conduzida em um intervalo de frequência de 10.000 a 0,01 Hz, em potencial de circuito aberto e com amplitude de perturbação de 10 mV. Ambas as análises, VC e EIS, foram realizadas em solução tampão fosfato salino PBS 0,1 mol L⁻¹ pH 7,4. A partir da **Figura 20** é possível observar que todos os voltamogramas apresentaram um comportamento característico do PPy:PSS, com contribuição capacitiva e processos redox discretos. O perfil obtido está em concordância com os reportados em literatura (HRYNIEWICZ 2022; KISIEL et al., 2021; ZHANG et al., 2010). Com o aumento da densidade de carga é possível observar um incremento na intensidade de corrente de pico anódico e um deslocamento para potenciais mais positivos, favorecendo uma dopagem do tipo-*p* no PPy:PSS. Para σ_c de 50 mC cm⁻² observa-

se uma onda voltamétrica associada à oxidação do polímero em torno de -0,2 V, que vai sendo deslocada para potenciais mais positivos quando a densidade de carga do filme aumenta. Para 800 mC cm^{-2} , a região associada à oxidação do polímero está localizada em torno de -0,15 V. Ainda, durante a varredura inversa, há um aumento na intensidade de corrente de pico catódico em que é possível também observar o mesmo comportamento para a corrente e potencial de picos anódicos: aumento de intensidade com deslocamento para potenciais mais negativos, saindo de -0,10 para em torno de -0,35 V, referente à redução do material, **Figura 20 (A)**, favorecendo uma dopagem do tipo-*n*.

Figura 20 - Perfil eletroquímico para diferentes densidades de deposição de carga para caracterização da modificação dos eletrodos de malha de aço com PPy:PSS. (A) voltamogramas cíclicos e (B) diagramas de Nyquist.



Fonte: O autor (2025).

O aumento da densidade de carga, no intervalo avaliado, acabou favorecendo um deslocamento dos potenciais de oxidação e redução do PPy:PSS. Esse deslocamento observado pode estar associado a maior quantidade de cargas presentes no filme polimérico, quer móveis ou não, que acaba por influenciar a distribuição e a estrutura eletrônica do material. Nesse sentido, em um estudo conduzido por Kiefer e colaboradores (2025) (KIEFER et al., 2025), os pesquisadores exploraram as propriedades multifuncionais de filmes de polipirrol polimerizados quimicamente sobre nanofibras de gelatina e pele suína para aplicação em atuadores e sensores e como a densidade de carga durante os processos de oxidação e redução

acaba afetando a troca de contraíons, influenciando a resposta eletroquímica do material. Em outro estudo conduzido por Lakner e colaboradores (2020) (LAKNER et al., 2020), foram avaliados filmes finos de PPy eletrodepositados sobre um cristal de silício para aplicação em supercapacitores. Nesta pesquisa, foi avaliada como a transferência de eletrólito e variações na espessura do material induzidas por aplicação de potencial em filmes ultrafinos de PPy alteram os mecanismos de troca iônica na matriz polimérica, induzindo mudanças nos processos de oxidação e redução do material. Adicionalmente, Mahmood e colaboradores (2025) (MAHMOOD et al., 2024), sintetizaram filmes híbridos de polipirrol e polietilenimina (PPy:PEI) por via química convencional, em que avaliaram como a alteração de íons dopantes e condições de síntese impactam em propriedades como condutividade elétrica e morfologia do material final, refletindo diretamente nos processos de oxidação e redução, uma vez que para maiores valores de densidade de carga do dopante, a condutividade do polímero aumenta, porém dopagem excessiva causa efeito contrário ao esperado, influenciando de maneira negativa a condutividade e alterando a morfologia do filme híbrido.

Conforme apresentado em seção anterior, durante a síntese eletroquímica o monômero pirrol sofre processo de oxidação, acoplamento e desprotonação. Esse processo se repete sucessivamente até que a cadeia do oligômero atinja um tamanho crítico, momento em que se torna insolúvel e começa a precipitar na superfície do eletrodo. A partir desse ponto, o crescimento do polímero continua na superfície do eletrodo, formando uma estrutura condutora que vai se expandindo progressivamente conforme novas unidades de pirrol são incorporadas ao material depositado (GENIES; BIDAN; DIAZ, 1983; HRYNIEWICZ, 2022). Ademais, um estudo conduzido por Gonçalves e colaboradores (2021) (GONÇALVES; PAIVA; PEREIRA, 2021), avaliou o processo de síntese potencioestática do polipirrol através da técnica de microbalança eletroquímica de cristal de quartzo. Neste trabalho, foi desenvolvido um método para calcular a mudança de área eletroativa do material durante a eletrossíntese a partir de dois diferentes potenciais, uma vez que, dependendo do potencial aplicado, o mecanismo de deposição muda, consequentemente, tanto a morfologia quanto as propriedades finais do polímero se tornam diferentes. Como resultado, os pesquisadores concluíram que no potencial de +0,8V acontecem duas etapas de nucleação: a primeira no substrato, que resulta em um filme denso, e a segunda sobre

o filme já formado, resultando em um material menos denso, corroborando com o mecanismo de síntese eletroquímica do polipirrol melhor aceita. Por outro lado, considerando o potencial de +1,2 V, foi possível verificar apenas um processo de nucleação, o que levou à formação de um filme espesso e, posteriormente, ao crescimento de fibras. No entanto, devido a esse potencial mais alto, o filme já depositado foi parcialmente degradado, levando a um material com propriedades eletroquímicas inferiores quando comparado ao da síntese considerando potencial de +0,8 V.

Durante a oxidação do monômero pirrol na presença do poli(4-estirenosulfonato de sódio), NaPSS, o polipirrol formado é dopado com íons sulfonato SO_3^- , se difundindo para a estrutura do filme, substituindo os contraíons provenientes do eletrólito, Na^+ , promovendo eletroneutralidade ao material. Esse processo é influenciado pela quantidade de material depositado no eletrodo, pois quanto maior a densidade de carga maior a quantidade de material depositado, conseqüentemente maior o número de elétrons e íons que serão necessários para manter a eletroneutralidade. Isto faz com que a reconfiguração da estrutura física do polímero ocorra de forma distinta em comparação aos eletrodos com menor densidade de carga (SOARES, 2019).

A partir das medidas de EIS foi possível complementar a caracterização da resposta dos eletrodos modificados em função das diferentes densidades de carga para o PPy:PSS. Na **Figura 20 (B)** observa-se a resposta dos filmes finos depositados sobre malha de aço. Os resultados obtidos foram modelados a partir da associação de um circuito equivalente de Randles modificado, de acordo com o mostrado na figura. A partir do diagrama de Nyquist é possível verificar que com o aumento da espessura do filme (aumento da densidade de carga), a resistência de transferência de carga, R_{ct} , diminui. Soares et al., (2019) (SOARES et al., 2019), avaliaram diferentes densidades de carga para PEDOT e observaram que, com o aumento da densidade de carga, o valor no parâmetro R_{ct} foi proporcional, diferentemente do observado para o PPy:PSS. Neste caso, o aumento da densidade de carga para o polipirrol acabou favorecendo os processos redox observados, uma vez que quanto mais material depositado, maior será o número de sítios eletroativos presentes, contribuindo para aumento das contribuições capacitivas e faradaicas do polímero. Portanto, o aumento da densidade de carga avaliado promoveu um aumento na

capacitância total do filme, refletindo uma diminuição da impedância para regiões de baixa frequência de acordo com o observado nos espectros.

O circuito equivalente utilizado para modelar os dados experimentais é composto por resistência de em série, R_s , que está associada à contribuição dos íons presentes no eletrólito, aos cabos, ou seja, resistência ôhmica do sistema. Este parâmetro é observado na região inicial do semicírculo. O componente seguinte, é um elemento de fase constante, Q_{dl} , que está associado à capacitância da dupla camada elétrica e se refere à capacidade do material de armazenar carga e o parâmetro n_{dl} , está associado à rugosidade do material. Em paralelo, tem-se a resistência de transferência de carga, R_{ct} , que se refere aos processos faradaicos que ocorrem na interface eletrodo/solução provenientes dos processos redox. Por fim, outro elemento de fase constante que descreve a capacitância de baixas frequências, Q_{lf} , e que está relacionado ao processo de intercalação de cargas na matriz polimérica e, assim como para Q_{dl} , temos o elemento n_{lf} , que está associado a homogeneidade do processo de intercalação de cargas. Ainda em relação aos parâmetros Q_{dl} , Q_{lf} , n_{dl} e n_{lf} , conforme apresentado na seção 3.1.1, a representação associada para o acúmulo de carga idealmente é um elemento capacitor, entretanto, deve-se levar em consideração a não idealidade da superfície do eletrodo modificado e, nesse caso, um elemento de fase constante é considerado.

Assim, os valores dos componentes do circuito estimados para diferentes densidades de carga foram modelados no software DropView 8400. Os valores estimados são apresentados na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Valores de parâmetros estimados a partir do ajuste de dados espectroscópicos de impedância eletroquímica para eletrodos modificados com PPY:PSS a diferentes densidades de carga.

	Densidade de carga / mC cm^{-2}				
	50	150	250	500	800
$R_s / \text{k}\Omega$	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
$R_{ct} / \text{k}\Omega$	20,08	12,18	10,99	5,77	3,76
$Q_{dl} / 10^{-5} \text{ F s}^{n-1}$	0,81	0,83	0,84	0,88	0,98
n_{dl}	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91
$Q_{lf} / 10^{-3} \text{ F s}^{n-1}$	0,31	0,61	0,51	0,95	1,31
n_{lf}	0,61	0,59	0,58	0,54	0,48
$\chi^2 / 10^{-3}$	1,06	2,08	3,14	4,14	5,19

Fonte: O autor (2025).

Os valores de resistência de solução R_s permitiram observar que não houve variação significativa a partir das densidades de carga avaliadas. Isso sugere a

estabilidade do eletrólito e das condições experimentais e que as variações observadas nos outros parâmetros do sistema, como R_{ct} , Q_{dl} e Q_{lf} , não sofreram influência por alterações do meio condutor, permitindo uma melhor separação dos efeitos em relação aos processos que ocorrem na interface eletrodo/eletrólito, o que facilita a modelagem do circuito equivalente associado.

Com o aumento da densidade de carga, há a diminuição da resistência de transferência de carga R_{ct} que pode estar relacionada ao aumento da área superficial do eletrodo, proporcionando uma quantidade maior de sítios ativos para adsorção de espécies eletroativas, facilitando a transferência de carga e reduzindo a resistência observada. Consequentemente, há um aumento na capacitância do sistema, sugerindo que há uma melhor formação da camada com o aumento da densidade de carga ou até mesmo uma maior resposta capacitiva da interface.

A capacitância da dupla camada elétrica, Q_{dl} , teve um aumento favorecido com o aumento da densidade de carga pois, quanto maior o valor de σ_c , mais cargas estão sendo acumulados na interface entre eletrodo/eletrólito. Esse comportamento pode ser justificado a partir do aumento da rugosidade na superfície e de uma maior área eletroativa favorecendo a capacitância da dupla camada. Adicionalmente, em relação aos valores de n_{dl} não foi observada variação significativa, sugerindo que a superfície do material se mantém homogênea para cada densidade de carga avaliada.

De modo similar à Q_{dl} , para Q_{lf} foi observado o mesmo comportamento, um aumento nos valores com o aumento da densidade de carga, uma vez que quanto mais filme depositado maior será o número de sítios disponíveis e uma maior quantidade de carga precisa ser contrabalanceada. Os valores de n_{lf} apresentam uma pequena oscilação, estando muito próximos, sugerindo que apesar de estar aumentando a quantidade de carga intercalada na matriz durante os processos de oxidação e redução, o processo se torna menos homogêneo.

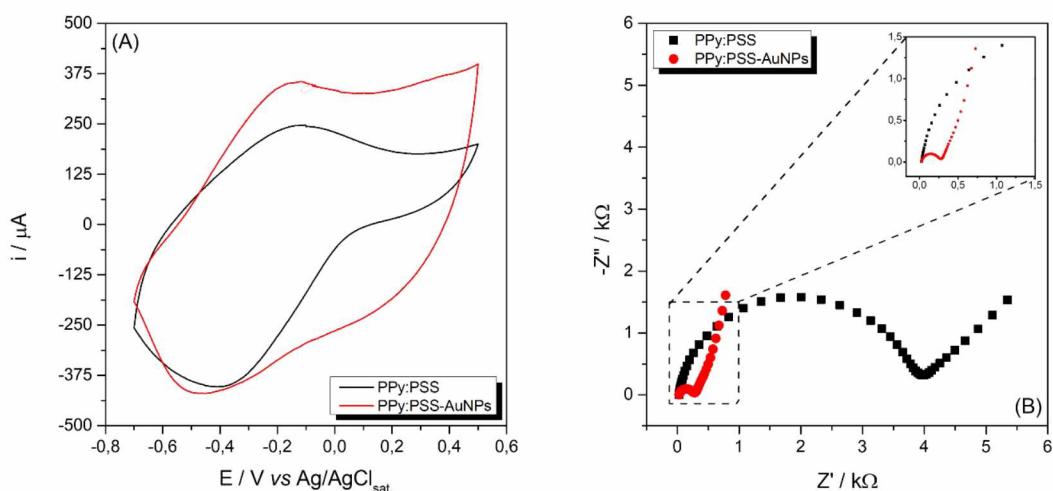
Sumariamente, com aumento das densidades de carga nos eletrodos modificados com PPy:PSS, foi possível observar uma diminuição na resistência de transferência de carga. Comportamento este que pode ser atribuído à maior capacitância da dupla camada elétrica, facilitando a acumulação de íons e promovendo uma resposta mais rápida às variações de potencial. A contribuição faradaica, associada ao aumento da densidade de carga, favoreceu a redução da resistência aos processos de oxidação e redução, evidenciada pela diminuição da

impedância em regiões de alta frequência. E, em se tratando de eletrodos modificados para aplicações eletroanalíticas, o comportamento elétrico como função da densidade de carga considerada é essencial para garantir um melhor desempenho da plataforma, facilitando a troca de carga e reduzindo a resistência total do sistema.

7.1.2 Formação e caracterização de PPy:PSS-AuNPs

Considerando os estudos iniciais realizados em relação às densidades de carga para formação de PPy:PSS, foi então realizada a incorporação de nanopartículas metálicas de ouro (AuNPs) ao material por cronoamperometria e, do mesmo modo que para o polímero avaliado, a quantidade de material na superfície do eletrodo foi controlada pela densidade de carga de deposição. Nesta etapa, a modificação dos eletrodos foi conduzida a partir da eletrodeposição do filme fino de PPy:PSS, com densidade de carga de 800 mC cm^{-2} , com posterior incorporação das AuNPs a partir de uma densidade de carga de 300 mC cm^{-2} . A avaliação da formação do filme fino nanocompósito foi feita, inicialmente, por voltametria cíclica a uma velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} **Figura 21 (A)**. Adicionalmente, espectros de impedância eletroquímica foram obtidos na faixa de 10.000 a 0,01 Hz, em potencial de circuito aberto, com uma perturbação de 10 mV, **Figura 21 (B)**. Ambas as medidas de VC e EIS foram realizadas em solução tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 na concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 21 - Comportamento eletroquímico para eletrodo modificado com PPy:PSS e PPy:PSS-AuNPs por (A) voltamogramas cíclicos e (B) digramas de Nyquist.



Fonte: O autor (2025).

A partir do perfil voltamétrico cíclico apresentado na **Figura 21 (A)** é possível observar que o PPy:PSS apresentou comportamento eletroativo, com processos de oxidação e redução bem definidos. Muito embora o comportamento eletroquímico do polipirrol não seja completamente elucidado, ele pode exibir processo de troca de cátions e ânions de ordem a manter a eletroneutralidade da estrutura, em que esses processos são controlados a partir de diferentes potenciais de polarização (OTERO; ARIZA, 2003). Para o PPy:PSS foram observados processos de oxidação e redução em torno de -0,10 e -0,40 V respectivamente. Quando incorporadas as AuNPs, é possível observar um acréscimo nas intensidades de corrente de pico anódico e catódico, quando comparadas apenas ao polímero e um deslocamento dos potenciais de oxidação de -0,10 V, considerando PPy:PSS, para -0,15 V após adição das AuNPs. Para redução, observa-se um deslocamento para potenciais mais negativos, indo de -0,40 para -0,50 V aproximadamente. Uma vez que a adição de AuNPs contribui para melhora nas propriedades eletrônicas de materiais poliméricos, esse aumento se deve a maior área eletroativa das nanopartículas metálicas de ouro que favorecem o transporte de carga no eletrodo modificado (LOGUERCIO et al., 2023). Ainda, é possível observar que a adição das AuNPs favoreceu o aparecimento de uma nova onda voltamétrica de redução em torno de +0,10 V que está associada à redução das nanopartículas metálicas de ouro vs. Ag/AgCl_{sat.}.

Corroborando com esses resultados, na **Figura 21 (B)** é apresentado os espectros de impedância eletroquímica para o PPy:PSS e PPy:PSS-AuNPs. Para o eletrodo modificado apenas com polímero, conforme discutido na seção anterior, a resistência de transferência de carga é maior, mesmo considerando σ_c 800 mC cm⁻². O efeito após a incorporação das nanopartículas metálicas de ouro no polímero favorece o transporte de carga devido a uma maior área eletroativa provenientes das AuNPs e, como resultado, a resistência de transferência de carga observada do nanocompósito diminui. Os dados espectroscópicos de impedância eletroquímica foram modelados no software DropView 8400. Os parâmetros estimados apresentados na **Tabela 3**.

Para os sistemas avaliados, ambos não apresentaram mudanças significativas nos valores de R_s . Já em relação à resistência de transferência de carga, R_{ct} , a diminuição observada após a incorporação das AuNPs foi de aproximadamente 12 vezes, favorecendo fortemente os processos redox do nanocompósito. O aumento

no parâmetro Q_{dl} está associado a maior área eletroativa do PPy:PSS-AuNPs quando comparada ao PPy:PSS, enquanto para n_{dl} há uma diminuição no valor observado, sugerindo que a rugosidade do material se modifica com a adição das AuNPs. Na região de baixa frequência, ocorre um aumento em Q_{lf} , que está associado a mudança no processo de intercalação de cargas na matriz do nanocompósito; corroborando com esse aumento observado, para n_{lf} também é observada a mesma tendência e isso sugere uma intercalação menos homogênea no eletrodo modificado após incorporação das AuNPs.

Tabela 3 - Parâmetros eletroquímicos estimados para PPy:PSS e PPy:PSS-AuNPs.

	PPy:PSS	PPy:PSS-AuNPs
$R_s / k\Omega$	0,03	0,03
$R_{ct} / k\Omega$	3,71	0,25
$Q_{dl} / 10^{-5} F s^{n-1}$	1,17	1,77
n_{dl}	0,91	0,84
$Q_{lf} / 10^{-3} F s^{n-1}$	2,47	5,14
n_{lf}	0,59	0,75
$\chi^2 / 10^{-3}$	1,86	1,62

Fonte: O autor (2025).

Assim como observado a partir da modelagem dos dados espectroscópicos de impedância eletroquímica para o PPy:PSS a diferentes densidades de carga, considerando o filme nanocompósito formado PPy:PSS-AuNPs, o valor de n_{lf} sofre uma variação expressiva, **Tabela 2** e **Tabela 3**, respectivamente. Esta variação está associada a uma mudança nos processos interfaciais que ocorrem entre o eletrodo/eletrólito. Segundo Lasia (2022) (LASIA, 2022) essa variação está relacionada a heterogeneidades morfológica e distribuição de constante de tempos na interface considerada e, com isso, a diminuição no valor deste parâmetro. Nesta região de baixas frequências, a impedância do sistema é governada por processos de transporte de massa, como a difusão de espécies iônicas. Para n_{lf} igual 0,00, temos a representação de um resistor ideal e, neste caso, o comportamento do sistema é puramente resistivo. Considerando $n_{lf} = 0,50$, temos um sistema com processo de difusão semi-infinita, enquanto para n_{lf} igual a 1,00 o comportamento do sistema é puramente capacitivo (GATEMAN et al., 2022). A partir dos valores de n_{lf} estimados para o PPy:PSS, os entre 0,45 e 0,60, estão associados a processos eletroquímicos que são controlados por difusão, entretanto com dispersão em virtude da porosidade, o que acaba tornando o processo de difusão mais complexo. Enquanto para o

PPy:PSS-AuNPs estão mais próximos à unidade, configurando, portanto, uma mudança de processo e estando associado a uma difusão mais restrita.

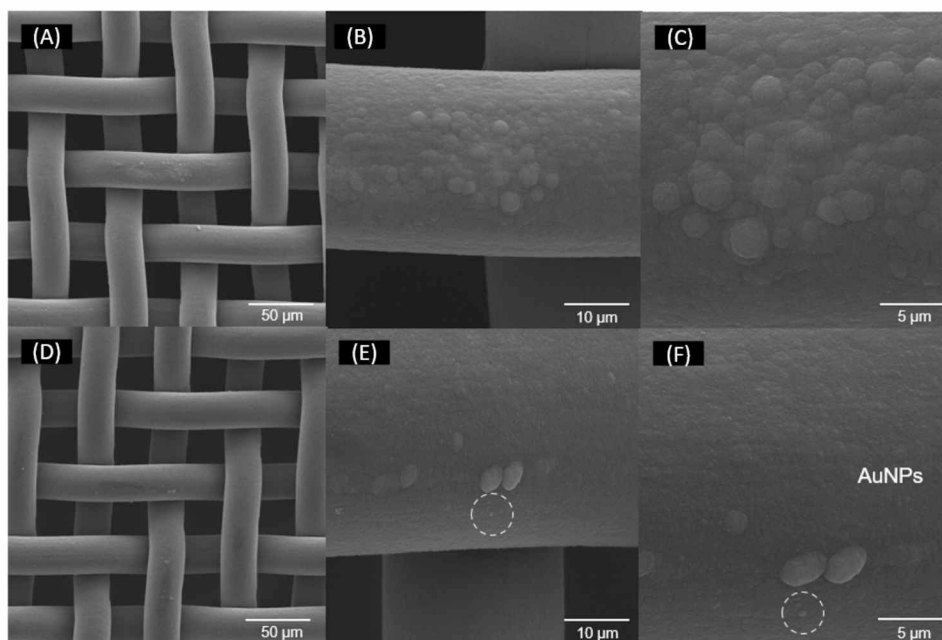
A modificação do eletrodo de malha de aço com PPy:PSS e PPy:PSS-AuNPs também foi caracterizada por microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de energia dispersiva de raios-X. Para esta última, apenas para matriz polimérica com AuNPs incorporadas. Na **Figura 22** são apresentadas as micrografias eletrônicas de varredura para ambos os nanomateriais eletrossintetizados sobre a malha de aço, PPy:PSS e PPy:PSS-AuNPs, obtidas a partir de elétrons secundários.

Um estudo conduzido por Puerres e colaboradores (2021) (PUERRES; ORTIZ; CORTÉS, 2021), avaliou pela primeira vez o mecanismo de nucleação e crescimento do polipirrol eletrossintetizado sobre substrato de óxido de estanho dopado com flúor (FTO). Determinaram, ainda, o efeito que o potencial de síntese possui sobre propriedades como morfologia, homogeneidade, adesão e condutividade dos filmes de PPy. A partir de medidas de microscopia eletrônica de varredura e de corrente transiente, J vs. t , constataram que os filmes obtidos a potenciais entre +0,9 e +1,0 V acabaram exibindo crescimento tridimensional com nucleação progressiva, morfologia globular, menor homogeneidade e maior adesão ao substrato avaliado. Em contrapartida, os filmes sintetizados entre +1,1 e +1,2 V seguem um crescimento bidimensional com nucleação instantânea. Em relação ao potencial de síntese, observaram que o aumento do potencial de polimerização resulta em filmes poliméricos com menor condutividade, destacando a importância de se modificar substratos a partir da eletropolimerização do monômero pirrol em aplicações de filmes finos que envolvam controle das propriedades do material.

A morfologia do polipirrol apresenta variação a depender do método de síntese e dos contraíons presentes no meio reacional devido aos eventos microscópicos que ocorrem nas fases iniciais de organização da cadeia dos oligômeros até formação da cadeia polimérica final. Nesse sentido, as interações inter e intramoleculares levam à formação de estruturas específicas. Se o PPy é obtido via síntese química convencional, a partir da polimerização oxidativa do monômero pirrol, a morfologia mais comum é uma estrutura chamada *cauliflower* (GOLBA; LOSKOT, 2023; PANDIT et al., 2020). Já considerando a rota de síntese eletroquímica, a morfologia do polipirrol é predominantemente globular (PUERRES; ORTIZ; CORTÉS, 2021). Para o PPy:PSS sintetizado, a morfologia observada foi a globular, acabando

por revestir a malha de aço constituinte do eletrodo. As nanopartículas metálicas de ouro são indicadas na região circular, **Figura 22 (E)-(F)**, que somente foi possível de identificação a partir de aplicação de contraste para elementos pesados, o que permitiu identificar os aglomerados de AuNPs.

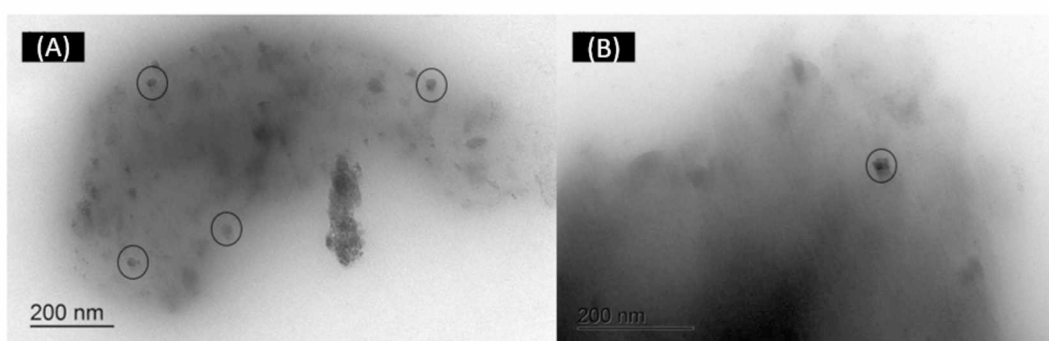
Figura 22 - Micrografias eletrônicas de varredura para: (A), (B), e (C) PPy:PSS; (D), (E) e (F) PPy:PSS-AuNPs, com destaque em círculo para aglomerado de nanopartículas metálicas de ouro incorporadas na matriz polimérica.



Fonte: autoria própria (2025).

Estas observações também foram verificadas por microscopia eletrônica de transmissão, conforme apresentado na **Figura 23 (A) e (B)**, logo abaixo.

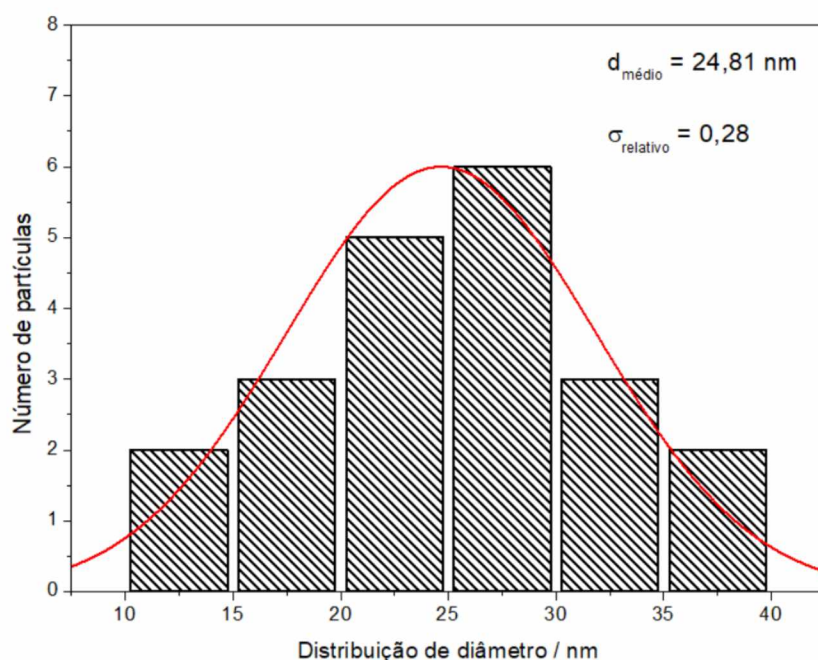
Figura 23 - Micrografias eletrônicas de transmissão para PPy:PSS-AuNPs com aumento de (A) 20.000 e (B) 30.000 vezes.



Fonte: o autor (2025).

De modo a corroborar com a micrografia eletrônica de transmissão observada na **Figura 23 (A)** foi possível obter uma distribuição de valores para os diâmetros das nanopartículas de ouro eletrossintetizadas sobre o eletrodo de malha de aço previamente funcionalizado com o filme de PPy:PSS, **Figura 24**, em que foi possível estimar que as AuNPs possuem diâmetro médio de 24,81 nm, $n = 27$.

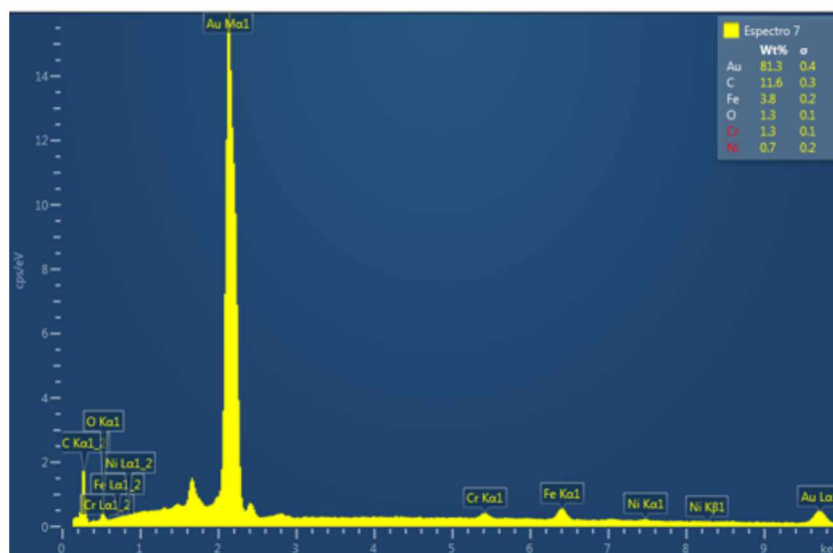
Figura 24 - Distribuição estimada do diâmetro das AuNPs observadas. Linha de ajuste: distribuição normal.



Fonte: O autor (2025).

De modo complementar, na **Figura 25** é mostrado o espectro de raios-X por energia dispersiva, corroborando com a informações obtidas pelas imagens de MEV, **Figura 22 (E) e (F)**. Para a fração da região selecionada, foi possível identificar a composição química elementar, onde foi atribuído uma contribuição em massa atômica de 81,3% para ouro quando comparado aos outros elementos presentes, como carbono, ferro, oxigênio, cromo e níquel, que majoritariamente são referentes à composição da malha de aço. Ainda, é possível verificar a banda de transição referente ao átomo de ouro, com posição média em torno de 2,1 keV, sendo atribuída, portanto, a transição Au $M_{\alpha 1}$ de acordo com o mapeamento realizado pelo software do equipamento utilizado.

Figura 25 - Espectros de raios-x por energia dispersiva apresentando análise química elementar para uma fração do eletrodo modificado com PPy:PSS-AuNPs.



Fonte: O autor (2025).

7.1.3 Construção de um imunossensor impedimétrico utilizando a proteína recombinante K39

Após a funcionalização do eletrodo com as nanoestruturas de PPy:PSS-AuNPs, sobre a superfície do filme foi ancorado o ácido 3-mercaptopropiônico 1 mmol L^{-1} , através da ligação covalente entre o grupo tiol terminal do 3-MPA à superfície das AuNPs, obtendo a formação de PPy:PSS-AuNPs-MPA. Então, os grupos funcionais terminais presentes na estrutura do alcanotiol, ácidos carboxílicos, foram ativados a partir dos agentes de *cross-linking* EDC/NHS $10:15 \text{ mmol L}^{-1}$, em que o EDC (1-etil-3(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) reage com o grupo $-\text{COOH}$ resultando na formação do intermediário o-acilisouréia que é altamente reativo. Então, para estabilizar o intermediário formado, a adição de N-hidroxissuccinimida (NHS) estabiliza este intermediário com a formação de um éster de NHS que é mais estável e tem mais afinidade por grupos amina, como os presentes principalmente em resíduos de lisina em proteínas e em outras biomoléculas.

A partir do eletrodo modificado com PPy:PSS-AuNPs-MPA e devidamente caracterizado, a proteína recombinante K39 foi utilizada como elemento de reconhecimento biológico para construção de um biossensor para detecção de anticorpos da leishmaniose visceral (LV). A proteína K39 é amplamente utilizada para

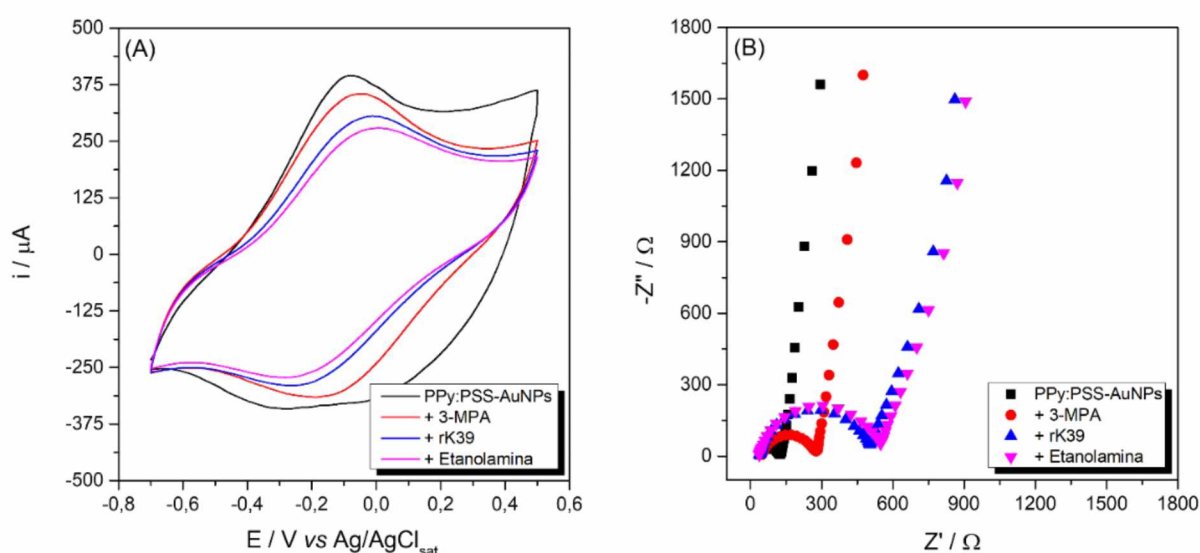
imunodiagnóstico sorológico da LV (DE SOUZA et al., 2019; FUJIMORI et al., 2023); uma vez que K39 atua como material antigênico que reconhece anticorpos específicos da LV, portanto o biossensor é denominado imunossensor. Assim, a proteína recombinante K39 foi ancorada na superfície usando uma concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ diluída em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4. Ainda, no processo de construção de biossensores, após ancoramento da biomolécula de reconhecimento é fundamental realizar o bloqueio dos grupos remanescentes inespecíficos. Para este propósito, foi utilizada uma solução aquosa de etanolamina 100 mmol L^{-1} .

A avaliação inicial do imunossensor utilizando a proteína recombinante K39 foi conduzida a partir das etapas compreendidas para a construção do biossensor, de acordo com o apresentado na **Figura 26**. A caracterização foi feita por voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica. De acordo com o observado na **Figura 26 (A)**, há uma diminuição na intensidade da corrente total do eletrodo biofuncionalizado após cada etapa de modificação. Essa diminuição evidencia que os processos de transferência eletrônica e de intercalação de cargas na matriz são desfavorecidos na presença das biomoléculas conjugadas à superfície. De maneira geral, esse comportamento sugere que adição de camadas com propriedades isolantes dificultam os processos eletroativos sobre a superfície eletródica. Ademais, a partir dos diagramas de Nyquist apresentados na **Figura 26 (B)** é possível verificar a concordância com os dados obtidos por voltametria cíclica, sendo possível observar um aumento na resistência de transferência de carga a partir de cada etapa, observado através do aumento do semicírculo saindo de região de altas frequências para baixas frequências. Aqui vale salientar que, após a etapa de funcionalização do PPy:PSS-AuNPs com ácido 3-mercaptopropiônico, os grupamentos terminais do 3-MPA são ativados (conversão dos grupos carboxílicos a grupos ésteres). Mas como não há diferenças nas respostas obtidas para este processo, esta etapa não foi apresentada nos resultados.

A partir dos dados obtidos por espectroscopia de impedância eletroquímica, os parâmetros eletroquímicos, **Tabela 4**, evidenciam que os valores relacionados à resistência de transferência de carga, R_{ct} , apresentaram mudança mais significativa entre as etapas. Na literatura, esse comportamento é evidenciado, constituindo uma característica comum em biossensores impedimétricos. Ainda, esse aumento nos valores de R_{ct} está relacionado ao impedimento do transporte de carga causado a

partir da deposição de cada camada associada à construção do imunossensor. A resistência ôhmica, R_s , apresentou uma ligeira variação para cada etapa, porém não significativa. Já para o Q_{dl} é possível observar uma diminuição, sugerindo que as camadas de estruturas sobre o eletrodo criam uma barreira na interface eletrodo/eletrólito, enquanto a oscilação verificada nos valores de n_{dl} podem estar associadas à mudança da morfologia na superfície do eletrodo. Para Q_{lf} foi observado uma diminuição, sugerindo que ocorre mudança no processo de intercalação de cargas na matriz após cada etapa de biofuncionalização e, adicionalmente, a discreta diminuição no valor de n_{lf} está associada a um processo de intercalação de cargas menos homogêneo.

Figura 26 - (A) comportamento voltamétrico cíclico e (B) diagramas de Nyquist para eletrodo modificado com filme de PPy:PSS-AuNPs e demais etapas de funcionalização para construção do imunossensor utilizando a proteína recombinante K39.



Fonte: O autor (2025).

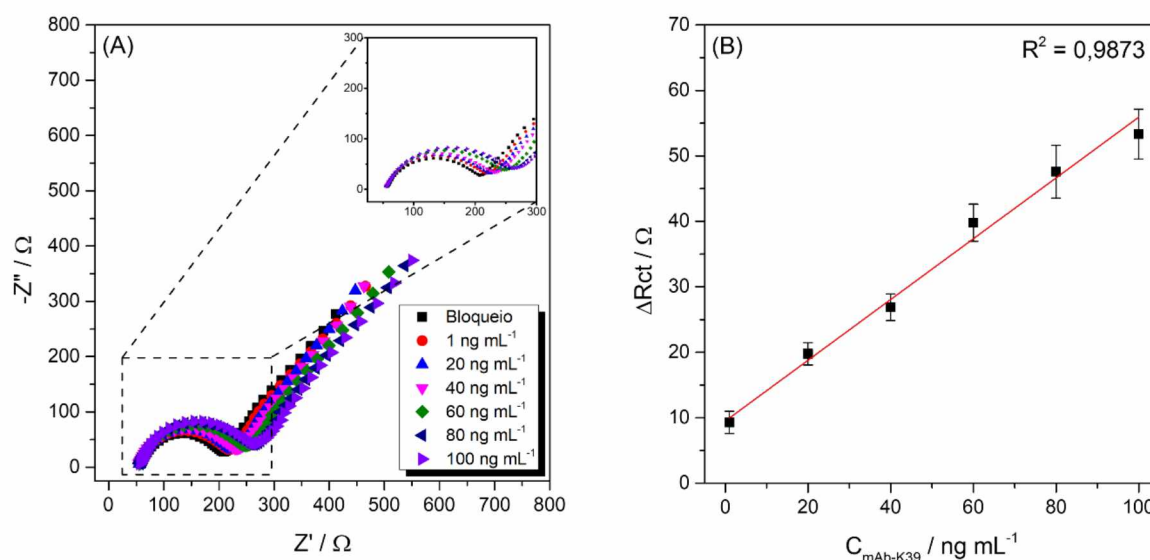
Tabela 4 - Parâmetros eletroquímicos estimados a partir da modelagem dos espectros de impedância eletroquímica para cada etapa do imunossensor baseado na proteína recombinante K39.

	PPy:PSS-AuNPs	3-MPA	rK39	Etanolamina
R_s / Ω	35,20	37,41	37,54	36,95
R_{ct} / Ω	91,17	311,98	469,88	514,95
$Q_{dl} / 10^{-5} F s^{n-1}$	2,57	2,22	1,59	1,55
n_{dl}	0,79	0,84	0,82	0,87
$Q_{lf} / 10^{-3} F s^{n-1}$	8,43	7,91	6,59	6,56
n_{lf}	0,86	0,84	0,87	0,83
$\chi^2 / 10^{-3}$	4,94	4,88	9,94	6,06

Fonte: O autor (2025).

Uma vez caracterizada a etapa de construção do imunossensor, o próximo passo consistiu em sua avaliação a partir da adição de diferentes concentrações: 1, 20, 40, 60, 80 e 100 ng mL⁻¹; de anticorpos monoclonais anti-K39, **Figura 27**. Da mesma forma como observado anteriormente com a avaliação etapa por etapa, para a interação antígeno-anticorpo, K39 e mAb-k39, o aumento no valor da resistência de transferência de carga também é observado.

Figura 27 - (A) Diagramas de Nyquist obtidos para o imunossensor baseado na proteína recombinante K39 exposto a diferentes concentrações de anticorpo monoclonal mAb-K39 e (B) Curva analítica obtida a partir do ΔR_{ct} como função da concentração de mAb-K39.



Fonte: O autor (2025).

A **Figura 27 (A)** evidencia as respostas obtidas do imunossensor exposto às diferentes concentrações de anticorpos monoclonais contra proteína recombinante K39, sendo possível verificar que o perfil de resposta para cada uma das $C_{mAb-K39}$ é melhor analisado a partir da mudança nos valores de resistência de transferência de carga, R_{ct} . Os dados espectroscópicos de impedância eletroquímica foram modelados a partir do circuito anteriormente apresentado na **Figura 20 (B)**. Adicionalmente, é possível observar que os valores obtidos de resistência à transferência de carga aumentam linearmente com o aumento da concentração do anticorpo monoclonal, como esperado, uma vez que para maiores concentrações de anticorpo sobre o eletrodo há um maior impedimento no processo de transferência eletrônica, dificultando os processos eletroativos sobre a superfície eletródica.

A curva analítica apresentada na **Figura 27 (B)** foi obtida a partir da variação na resposta de R_{ct} para cada uma das concentrações avaliadas do anticorpo

monoclonal (Ab-K39), sendo cada valor subtraído do valor de R_{ct} da etapa do bloqueio, considerado o branco (CRISTEA, 2021). Todas as concentrações avaliadas foram medidas no mesmo conjunto de imunossensores e os ensaios foram realizados em triplicata, considerando eletrodos diferentes. A partir do comportamento linear da variação da resposta medida como função da concentração de anticorpo monoclonal foi possível obter a equação da regressão linear:

$$\Delta R_{ct} = 9,5088 + 0,4642 \times [C_{mAb-K39}] \text{ (ng mL}^{-1}\text{)} \quad (11)$$

Com base no perfil analítico apresentado pelo imunossensor proposto utilizando proteína recombinante K39, foi possível estimar os limites de detecção e quantificação, LOD e LOQ, respectivamente. Para estes cálculos foi considerado:

$$LOD = \frac{3,3 \times DPA}{m} \quad (12)$$

$$LOQ = \frac{10 \times DPA}{m} \quad (13)$$

Onde DPA representa o desvio-padrão amostral de 3 medidas referente apenas à etapa de bloqueio e, por conseguinte, anterior à exposição às concentrações de anticorpo; e m é o coeficiente angular da reta obtida a partir da regressão linear da curva analítica apresentada na **Figura 27 (B)**. Com isso, a partir das equações (12) e (13) foi possível estimar os limites de detecção e quantificação de 0,86 e 2,89 ng mL⁻¹, respectivamente ou 5,79 e 19,32 pmol L⁻¹.

Apesar de existirem alguns poucos trabalhos na literatura envolvendo aplicações de eletrodos modificados para imunodiagnóstico eletroquímico, quer voltamétrico ou impedimétrico, para leishmaniose visceral canina, ainda há opções estratégicas interessantes, tanto sob o ponto de vista estrutural quanto de sua relevância. Martins e colaboradores (MARTINS et al., 2020) propuseram um biossensor eletroquímico-voltamétrico baseado em eletrodo de carbono impresso modificado com ouro para detecção específica da leishmaniose visceral e apresentaram um limite de detecção de 200 ng mL⁻¹. Em um estudo mais recente, Martins e colaboradores (MARTINS et al., 2024) utilizaram um eletrodo de carbono impresso comercial e realizaram modificação química da superfície a partir da adição de óxido de grafeno e nanopartículas de ouro para determinação voltamétrica de

anticorpos da leishmaniose visceral e obtiveram um limite de detecção de $5,58 \text{ mg mL}^{-1}$. Nazari-Vanani e colaboradores (NAZARI-VANANI; HELI; SATTARAHMADY, 2020) desenvolveram um genossensor impedimétrico para *Leishmania infantum* baseado em um disco de platina modificado com nanoestruturas de sulfeto de cádmio, onde o dispositivo apresentou limite de detecção de $1,2 \text{ ng mL}^{-1}$. Ainda, Liberato e colaboradores (LIBERATO et al., 2019) propuseram um biossensor eletroquímico para detecção rápida de anticorpos de leishmaniose a partir de uma blenda polimérica formada por poliamida e nanofibras de quitosana, com limite de detecção de $0,2 \text{ pg mL}^{-1}$.

Agora, não relacionados ao contexto eletroquímico, porém relevantes, Deris e colaboradores (DERIS et al., 2022) desenvolveram um bioconjugado a partir de nanopartículas de ouro funcionalizadas como estratégias de amplificação de sinal para diagnóstico de leishmaniose visceral e obtiveram um limite de detecção de $32 \text{ fg } \mu\text{L}^{-1}$. Ainda, considerando técnicas de transdução óticas, Volpe e colaboradores (VOLPE et al., 2024) desenvolveram um biossensor baseado em ressonância de plásmons de superfície, biofuncionalizados com peptídeos sintéticos para detecção de leishmaniose visceral canina e obtiveram um valor de $1,05 \text{ nmol L}^{-1}$ para limite de detecção.

Nesse sentido, os valores de LOD e LOQ estimados neste projeto, até o presente momento, encontram-se dentro do intervalo de valores já reportados em literatura; contudo, a estratégia proposta apresenta como vantagem o uso de um eletrodo flexível e descartável e de relativo baixo custo. Vale salientar que o objetivo deste estudo foi de apenas avaliar a potencialidade da plataforma baseada em eletrodo de malha de aço e que, funcionalizado com nanomateriais estratégicos, permitiu a identificação rápida e eficaz de anticorpos monoclonais a partir da proteína recombinante K39.

7.1.4 Construção de um imunossensor impedimétrico utilizando a proteína recombinante C1

A proteína recombinante C1 é pertencente à classe das proteínas hipotéticas, uma vez que não se sabe qual a função dessa proteína no protozoário de *Leishmania spp.* Essa biomolécula foi selecionada com base em quatro critérios diferentes. Primeiramente, a proteína C1 não foi anteriormente descrita em literatura na

construção de biossensores eletroquímicos, entretanto os primeiros trabalhos são relacionados à biossensores óticos baseados na técnica de ressonância de plásmons de superfície e microbalança de cristal de quartzo (SOUTO, et al., 2013a; SOUTO, et al., 2015b). Em segundo lugar, essa proteína é conservada em espécies de *Leishmania*. O terceiro critério consistiu na presença de epítomos de células B como previsto em dois softwares simultaneamente (BCPred e ABCPred). O quarto fator, é que os epítomos mapeados não reagiram com soros caninos infectados com *Trypanosoma cruzi*, nem mesmo com soros caninos saudáveis em *imunoblottings*. Adicionalmente, seus epítomos são altamente imunogênicos quando testados com soros caninos infectados com *L. infantum* (GALVANI et al., 2021; JAIN et al., 2023)

Nesse sentido, a proteína recombinante C1 e seus anticorpos específicos (imunoglobulinas G - IgGs) foram utilizados na plataforma nanoestruturada baseada em PPy:PSS-AuNPs-3-MPA para fins de avaliação da interação antígeno-anticorpo, **Figura 28**. Todas as etapas associadas à construção e caracterização da plataforma já foram descritas na seção anterior (para a proteína recombinante K39). Nesta etapa, a unidade de biorreconhecimento utilizada foi a proteína recombinante C1 na concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ diluída em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4. O imunossensor foi avaliado frente à exposição de cinco concentrações: 0,1, 1, 10, 100 e 1000 pg mL^{-1} ; de anticorpos policlonais para proteína recombinante C1, com fins de verificação do potencial de biossensoriamento ao usar a C1.

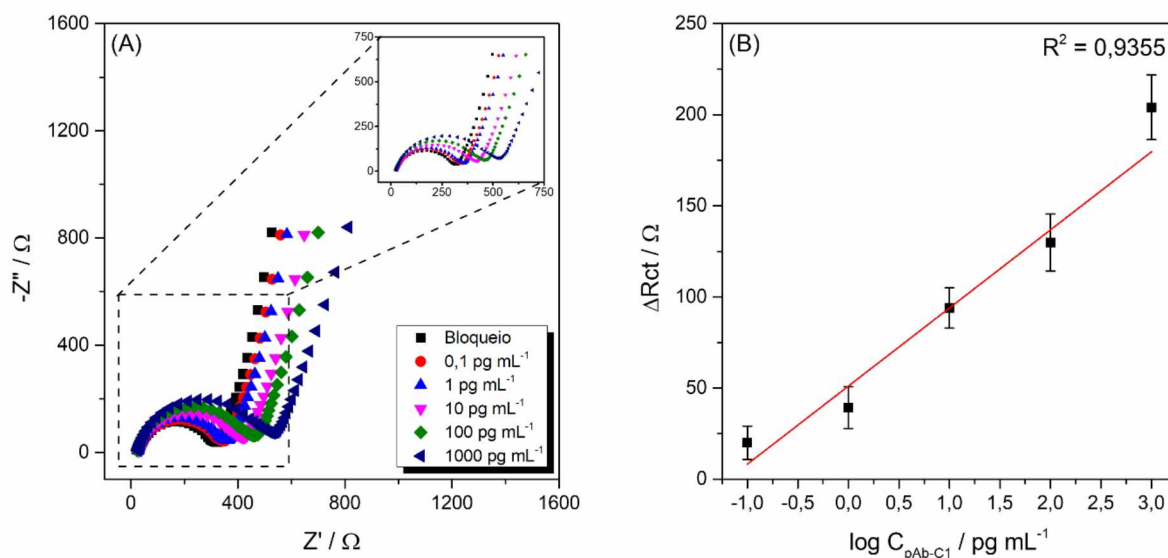
Como observado para o par K39-mAb-K39, o comportamento para a formação do complexo C1-Ab-C1 possibilita verificar o perfil de resposta para cada uma das concentrações de anticorpo policlonal avaliada. O parâmetro eletroquímico utilizado para expressar a correspondente resposta é o valor de resistência de transferência de carga, R_{ct} . Ainda, é possível observar um aumento no R_{ct} com o aumento da concentração de anticorpo para a faixa avaliada, de 0,1 a 1000 pg mL^{-1} . Para maiores concentrações de anticorpo sobre o eletrodo há um maior impedimento no processo de transferência eletrônica dificultando mais significativamente os processos eletroativos sobre a superfície eletródica.

Na **Figura 28 (B)** é apresentada a relação linear para o imunossensor construído com a proteína recombinante C1, com avaliação no parâmetro eletroquímico ΔR_{ct} em função do logaritmo da concentração de anticorpos policlonais

para C1. A equação da regressão linear obtida a partir da curva analítica apresentada é dada por:

$$\Delta R_{ct} = 51,0833 + 42,8542 \times \log[C_{pAb-C1}] \text{ (pg mL}^{-1}\text{)} \quad (14)$$

Figura 28 - (A) Diagramas de Nyquist obtidos para imunossensor baseado na proteína recombinante C1 exposto a diferentes concentrações de anticorpo policlonal pAb-C1 e (B) Curva analítica obtida a partir do ΔR_{ct} como função da concentração de pAb-C1.



Fonte: O autor (2025).

A plataforma avaliada apresentou elevada capacidade para detecção dos anticorpos da leishmaniose visceral, permitindo estimar limites de detecção e quantificação em 0,58 e 1,95 pg mL⁻¹, respectivamente, ou 3,91 e 13,05 fmol L⁻¹. Nesse contexto, os resultados mostram que todo o processo adotado para a modificação do eletrodo e posterior biofuncionalização da plataforma avaliada conduziram a resultados satisfatórios.

Conforme citado anteriormente, existem poucos trabalhos em literatura utilizando a proteína recombinante C1 em imunossensor para detecção de anticorpos contra a leishmaniose visceral, quer eletroquímico ou ótico. Nesse sentido, um trabalho reportado por Souto e colaboradores (2015) (SOUTO et al., 2015a) faz o uso da técnica de ressonância de plásmons de superfície (SPR) para desenvolver um imunossensor do tipo ótico para detecção de anticorpos anti-C1 utilizando como elemento de reconhecimento a proteína recombinante C1 com função desconhecida para *L. infantum*. Este estudo se baseou no uso de um substrato de ouro

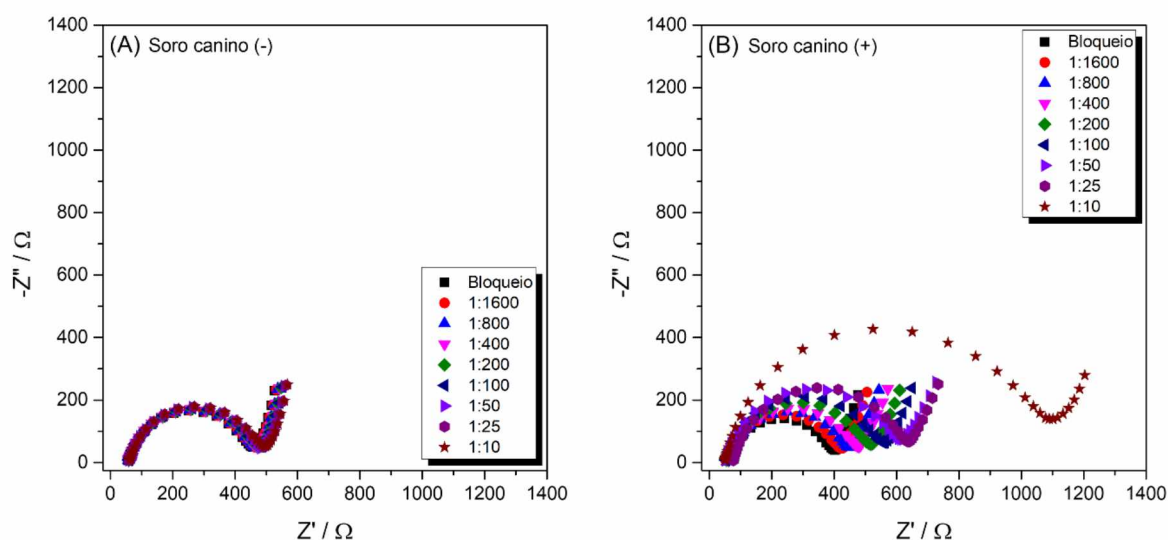
funcionalizado com monocamadas auto-organizadas de cisteamina em combinação com o dendrímero poli(amidoamina) de 4ª geração (PAMAM(G4)) para reconhecimento de anticorpos específicos da leishmaniose visceral. A plataforma apresentou limites de detecção e quantificação de $7,37 \text{ nmol L}^{-1}$ e $7,83 \text{ nmol L}^{-1}$, respectivamente. Em um estudo mais recente, Oliveira, Souto e Zarbin (2024) (OLIVEIRA; ZARBIN; SOUTO, 2024) exploraram a versatilidade de nanoestruturas 2D e 3D baseadas em dendrímeros estabilizadas com nanopartículas de prata e avaliaram o uso em um imunossensor também baseado em SPR para detecção de anticorpos para *L. infantum*, entretanto, neste estudo não foram apresentados limites de detecção e quantificação.

Com base no exposto, a partir da plataforma aqui proposta usando como material de reconhecimento a proteína recombinante C1 os limites de detecção e quantificação obtidos são competitivos com os apresentados em literatura. Aqui, mais uma vez, cabe salientar o que o objetivo deste projeto foi avaliar a potencialidade da estratégia baseada em um eletrodo de malha de aço funcionalizado com nanoestruturas de PPy:PSS-AuNPs para detecção de anticorpos para leishmaniose visceral. Além disso, avaliar o potencial de novas proteínas recombinantes de *L. infantum* para serem exploradas no diagnóstico sorológico dessa parasitose.

7.1.5 Uso dos biossensores construídos com as proteínas recombinantes K39 e C1 para detecção de anticorpos em soros caninos

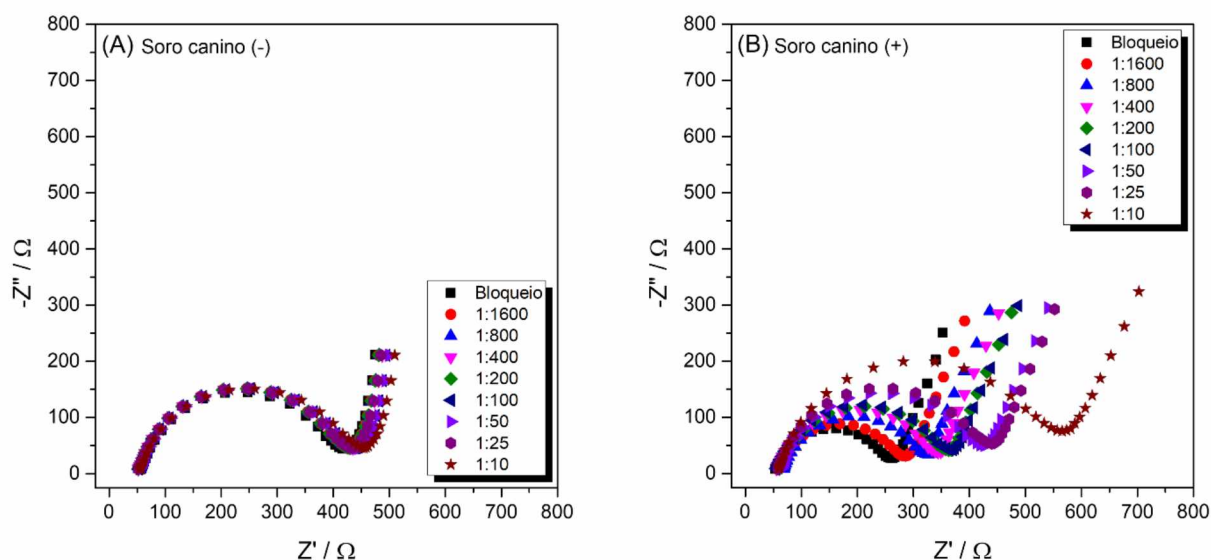
As respostas dos imunossensores utilizando as proteínas recombinantes K39 e a proteína com função desconhecida em *L. infantum* (C1) foram avaliadas em *pools* de soros caninos dos grupos positivo e negativo para leishmaniose visceral canina. A **Figura 29** evidencia os resultados obtidos com a K39 e na **Figura 30** os resultados com a C1. Para melhor verificar a diferenciação da resposta para os soros caninos positivos e negativos, na **Figura 31** é apresentada a variação do parâmetro de resistência de transferência de carga, ΔR_{ct} , como função dos diferentes fatores de diluição para os *pools* de soros negativos e positivos para leishmaniose visceral canina. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

Figura 29 - Diagramas de Nyquist obtidos para imunossensor baseado em proteína recombinante K39 exposto a diferentes fatores de diluição em *pools* (A) negativo ($n = 5$) e (B) positivo ($n = 5$) para leishmaniose visceral canina.



Fonte: O autor (2025).

Figura 30 - Diagramas de Nyquist obtidos para imunossensor baseado em proteína recombinante C1 exposto a diferentes fatores de diluição em *pools* (A) negativo ($n = 5$) e (B) ($n = 5$) positivo para leishmaniose visceral canina.

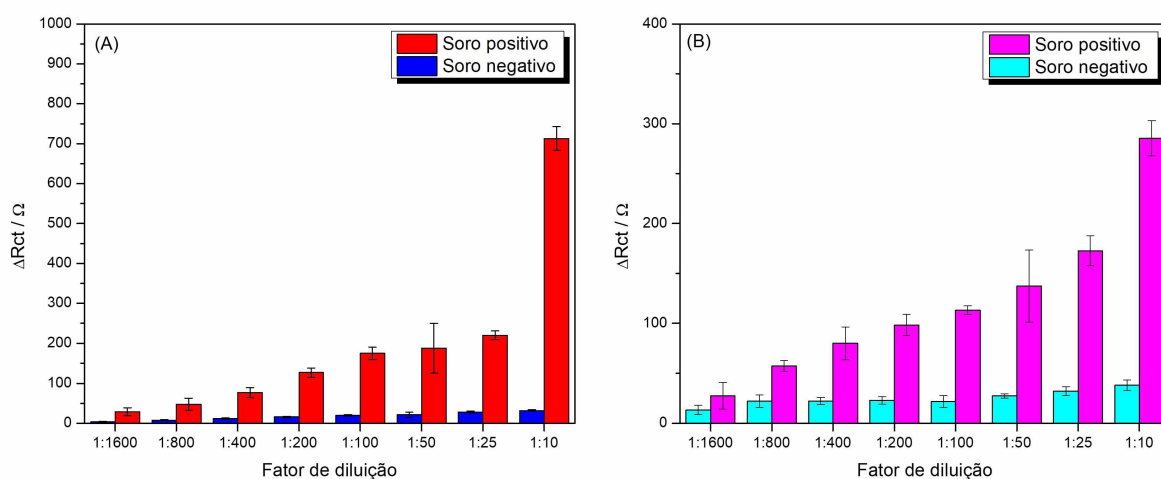


Fonte: O autor (2025).

O imunossensor utilizando proteína K39 apresentou um aumento significativo no valor da resistência de transferência de carga para fatores de diluição menores para o soro positivo. Isso sugere que há uma maior interação entre os anticorpos presentes no soro com a proteína K39 biofuncionalizada a plataforma baseada em

PPy:PSS-AuNPs-3-MPA. Para o imunossensor utilizando a C1, o mesmo comportamento observado para o R_{ct} é verificado, entretanto, considerando o fator de diluição de 1:10, a proteína K39 tem um aumento mais expressivo no valor da resistência de transferência de carga quando comparada a proteína C1. Para concentrações mais diluídas, ambas as plataformas apresentaram sensibilidade ao detectar anticorpos para leishmaniose visceral canina.

Figura 31 - Representação do perfil de diferenciação dos imunossensores baseados em (A) rK39 e (B) rC1 expostos aos *pools* de soros negativo e positivo para leishmaniose visceral canina para cada fator de diluição considerado.



Fonte: O autor (2025).

Nesse sentido, os imunossensores propostos demonstraram excelente capacidade de discriminação entre os grupos positivo e negativo para leishmaniose visceral. Essa característica configura um ponto de relevância, sobretudo por se tratar de uma abordagem diagnóstica alternativa, uma vez que a especificidade das respostas representa um dos principais critérios de eficácia da estratégia. Ademais, a distinção clara entre as amostras dos hospedeiros infectados e não infectados evidencia o potencial dos biossensores como ferramenta para triagem e monitoramento desta doença, especificamente em regiões endêmicas, onde o diagnóstico precoce é essencial para o controle epidemiológico.

Além disso, cabe ressaltar que, no contexto de biossensores respostas inespecíficas ainda constituem um dos maiores desafios técnicos, o que acaba por comprometer a acurácia dos resultados obtidos e limita a aplicabilidade clínica de

muitos sistemas. Sob essa perspectiva, a seletividade observada nos imunossensores utilizando as proteínas recombinantes K39 e C1 representa um avanço significativo, contribuindo para suprir limitações e abrir caminhos para o desenvolvimento de plataformas diagnósticas mais robustas, com altas sensibilidades e adaptáveis a diferentes contextos de saúde pública.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, foi avaliada a modificação eletroquímica de eletrodos de malha de aço com nanoestruturas do polímero condutor polipirrol (PPy) decoradas com nanopartículas metálicas de ouro (AuNPs), com objetivo de verificar o potencial da plataforma na detecção de anticorpos contra *L. infantum*, propondo uma nova metodologia para sorodiagnóstico da leishmaniose visceral canina. A modificação do eletrodo foi bem-sucedida e avaliada por técnicas eletroquímicas, espectroscópica e microscópicas. O eletrodo modificado com PPy:PSS-AuNPs foi aplicado em biossensoriamento por meio da formação de uma monocamada auto-organizada baseada no alcanotiol ácido 3-mercaptopropiônico, de forma a obter maior orientação no processo de imobilização, via ligação covalente, das proteínas recombinantes K39 e C1 sobre o nanomaterial.

A partir das técnicas de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica foi possível caracterizar para cada etapa no processo de construção dos imunossensores. Para detecção de anticorpos específicos monoclonais e policlonais purificados, especificamente, a plataforma proposta neste projeto apresentou boa sensibilidade durante o processo de avaliação da interação antígeno-anticorpo, tanto para o par K39-mAb-K9 quanto para C1-AbC1, possibilitando estimar os limites de detecção e quantificação em 5,79 e 19,32 pmol L⁻¹ e 3,91 e 13,05 fmol L⁻¹, respectivamente. Também foi possível aplicar os biossensores desenvolvidos para detectar anticorpos em amostras de soro canino. Nesta etapa, os imunossensores foram expostos a diferentes fatores de diluição de *pools* de soros negativo e positivo, o que permitiu concluir que ambas as plataformas apresentaram boa sensibilidade e seletividade, com excelente discriminação das amostras de cães infectados e não infectados.

De modo geral, os resultados apresentados neste projeto são promissores, evidenciando a viabilidade da plataforma nanoestruturada baseada em PPy:PSS-AuNPs utilizando proteínas recombinantes K39 e C1 com potencial para detecção de anticorpos para leishmaniose visceral canina. A detecção dos anticorpos foi realizada tanto em amostras purificadas quanto em soros caninos pouco diluídos e muito diluídos, permitindo detecção para soros entre 10 a 1600 vezes diluídos.

Complementarmente aos objetivos apresentados, espera-se que a partir desta pesquisa fundamental este método alternativo possa ser validado, considerando

todos os desdobramentos necessários, de modo a contribuir com a utilização de imunossensores eletroquímicos no contexto das doenças tropicais negligenciadas, impactando de modo positivo as estatísticas globais associadas a não apenas essa doença. Por fim, a plataforma utilizada neste trabalho se mostrou promissora, podendo ser explorada não apenas como estratégia para o imunodiagnóstico da leishmaniose visceral canina, mas também como base para o desenvolvimento de sistemas voltados à investigação da interação entre antígeno e anticorpo em diferentes contextos médicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, S. et al. Electrical conductivity-based ammonia sensing properties of polypyrrole/MoS₂ nanocomposites. **Polymers**. v. 12, p. 1-13, 2020.
- AKHLAGHI, A. A. et al. Challenges and opportunities for developing electrochemical biosensors with commercialization potential in the point-of-care diagnostics market. **ECS Sensors Plus**. v. 3, p. 1-15, 2024.
- ALAVI, S. M. M. et al. Identifiability of generalized Randles circuit models. **IEEE Transactions on Control Systems Technology**. v. 25, p. 2112-2120, p. 2016.
- AMETHIYA, Y. et al. Comparative analysis of breast cancer detection using machine learning and biosensors. **Intelligent Medicine**. v. 2, p. 69-81, 2022.
- ANNY, C. A. et al. A step-by-step guide for the production of recombinant protein fluorescent TAT-HA-Tagged protein and their transduction into mammalian cells. **Current Protocols**. v. 4, p. 1-26, 2024.
- BARMAN, M. et al. Recombinant DNA technology: Technique and applications in modern era. **Futuristic Trends in Biotechnology**. v. 2, p. 1-14, 2023.
- BÉLARD, S. et al. Sonographic findings in visceral leishmaniasis – A narrative review. **Travel Medicine and Infectious Disease**. v. 39, p. 1-9, 2021.
- BEREGOI, M. et al. Bioinspired polypyrrole based fibrillary artificial muscle with actuation and intrinsic sensing capabilities. **Scientific Reports**. v. 12, p. 1-10, 2022.
- BHAIYYA, M. et al. Role of machine learning assisted biosensors in point-of-care testing for clinical decisions. **ACS Sensors**. v. 9, p. 4495-4519, 2024.
- BIGDELI, I. K. et al. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) for biosensing. *In*: THOMAS, S.; NGUYEN, T. A.; AHMADI, M.; FARMANI, A.; YASIN, G. **Nanosensors for Smart Manufacturing**. Canadá: Elsevier, 2021. p. 533-554.
- BOGOMOLOVA, A. et al. Challenges of electrochemical impedance spectroscopy in protein biosensing. **Analytical Chemistry**. v. 81, p. 3944-3949, 2009.
- BOLTO, B. A.; WEISS, D. E. Electronic conduction in polymers. II. The electrochemical reduction of polypyrrole at controlled potential. **Australian Journal of Chemistry**. v. 16, p. 1076-1089, 1963.
- BOLTO, B. A. et al. Electronic conduction in polymers. III. Electronic properties of polypyrrole. **Australian Journal of Chemistry**. v. 16, p. 1090-1103, 1963.
- BORGES, M. S. et al. Factors associated with the expansion of leishmaniasis in urban area: A systematic and bibliometric review (1959-2021). **Journal of Public Health Research**. v. 11, p. 1-9, 2022.

BORGES, P. A. F. et al. Current progress in the development of biosensors for the diagnosis of neglected tropical diseases. **Systematic Bioscience and Engineering**. v. 1, p. 1-12, 2021.

BRETT, C. M. A. Electrochemical impedance spectroscopy in the characterization and application of modified electrode for electrochemical sensors and biosensors. **Molecules**. v. 27, p. 1-17, 2022.

BREDAS, J. L; STREET, G. B. Polarons, bipolarons, and solitons in conducting polymers. **Accounts of Chemical Research**. v.18, p. 309-315, 1985.

CAMPUZANO, S. et al. New challenges in point of care electrochemical detection of clinical biomarkers. **Sensors and Actuators: B. Chemical**. v. 345, p. 1-15, 2021.

CARVALHO, L. A. et al. Espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao estudo das reações heterogêneas em ânodos dimensionalmente estáveis. **Química Nova**. v. 29, p. 796-804, 2006.

CARVALHO, L. S. et al. Lethality among individuals infected with visceral leishmaniasis in Brazil: A retrospective study (2007-2018). **Protozoology**. v. 121, p. 725-736, 2022.

CARVALHO, S. F. G. et al. Should an intersection between visceral leishmaniasis endemicity and the COVID-19 pandemic be considered? **Medical Hypotheses**. v. 144, p. 1-2, 2020.

CAVALCANTE, F. R. A. et al. Human visceral leishmaniasis: epidemiological, temporal and spatial aspects in Northeast Brazil, 2003-2017. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 62, p. 1-10, 2020.

CORDEIRO, T. A. R. et al. Impedimetric immunosensor for rapid and simultaneous detection of chagas and visceral leishmaniasis for point of care diagnosis. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 169, p. 1-8, 2020.

COSTA-DA-SILVA, A. C. et al. Immune responses in leishmaniasis: an overview. **Tropical Medicine and Infectious Disease**. v. 7, 54, p. 1-16, 2022.

CRISTEA, D.-S. Development of an affinity-based impedimetric biosensor using gold screen-printed electrodes. Dissertação, Aalborg University, 2021.

CURTIN, J. M.; ARONSON, N. E. Leishmaniasis in the United States: Emerging issues in a region of low endemicity. **Microorganisms**. v. 9, p. 1-23, 2021.

DANTAS-TORRES, F. Canine leishmaniasis in the Americas: Etiology, distribution, and clinical and zoonotic importance. **Parasites & Vectors**. v. 17, p. 1-10, 2024.

DE MATTEIS, V. et al. Synergistic effect induced by gold nanoparticles with polyphenols shell during thermal therapy: Macrophage inflammatory response and cancer cell death assessment. **Cancers**. v. 13, p. 1-31, 2021.

LUNA, R. L. N. et al. Rapid isothermal molecular tests to discriminate between *Leishmania brasiliensis* and *Leishmania infantum* infection in dogs. **Parasites & Vectors**. v. 18, p. 1-9, 2025.

SOUZA, L. M. B. et al. Production of kinesin-related recombinant protein (Lbk39) from *Leishmania braziliensis* by *Leishmania tarentolae* promastigotes and its application in the serodiagnosis of leishmaniasis. **One Health**. v. 8, p. 1-8, 2019.

DELLER, A. E. et al. PEDOT:PSS-based composite as voltametric sensor for the detection of primicarb. **Polymers**. v.15, p. 1-11, 2023.

DEPARTAMENTO DE ASSUNTOS ECONÔMICOS E SOCIAIS. **Objetivos do desenvolvimento sustentável**. Disponível em:

<www.un.org/esa/population/unpop.htm>. Acesso em: 28 fev. 2025.

DERIS, S. et al. The efficacy of AuNP-probe conjugate nanobiosensor in non-amplification and amplification forms for the diagnosis of leishmaniasis. **BMC Infectious Diseases**. v. 22, p. 1-10, 2022.

DIAS, I. F.; SILVA, M. A. Introdução. In: _____. (org.). **Polímeros semicondutores**. São Paulo: Livraria da Física, 2012a, p. 11-19.

DIAS, I. F.; SILVA, M. A. Modelagem e estrutura eletrônica de polímeros conjugados. In: _____. (org.). **Polímeros semicondutores**. São Paulo: Livraria da Física, 2012b, p. 71-81.

DUARTE, A. G. S. et al. An updated systematic review with meta-analysis and meta-regression of the factors associated with human visceral leishmaniasis in the Americas. **Infectious Diseases of Poverty**. v. 14, p. 1-22, 2025.

DUTTA, S. et al. The effect of electroactive length and intrinsic conductivity on the actuation behavior of conducting polymer-based yarn actuators for textile muscles. **Sensors and Actuators B: Chemical**. v. 370, p. 1-11, 2022.

ENGELS, D.; ZHOU, X. N. Neglected tropical diseases: and effective global response to local poverty-related disease priorities. **Infectious Diseases of Poverty**. v. 9, p. 1-9, 2020.

FIGUEIREDO, C. et al. An oxygen-insensitive amperometric galactose biosensor based on galactose oxidase co-immobilized with an os-complex modified redox polymer. **Electrochimica Acta**. v. 472, p. 1-8, 2023.

FUJIMORI, M. et al. Recombinant protein KR95 as an alternative for serological diagnosis of human visceral leishmaniasis in the Americas. **PLoS ONE**. v. 18, p. 1-21, 2023.

FURTADO, R. R. et al. Visceral leishmaniasis urbanization in the brazilian amazon is supported by significantly higher infection transmission rates than in rural area. **Microorganisms**. v. 10, p. 1-17, 2022.

GATEMAN, S. M. et al. On the use of a constant phase element (CPE) in electrochemistry. **Current Opinion in Electrochemistry**. v. 36, p. 101133, 2022.

GALVANI, N. C. et al. ChimLeish, a new recombinant chimeric protein evaluated as a diagnostic and prognostic marker for visceral leishmaniasis and human immunodeficiency virus coinfection. **Parasitology Research**. v. 120, p. 4037-4047, 2021.

GENIES, E. M.; BIDAN, G.; DIAZ, A. F. Spectroelectrochemical study of polypyrrole films. **Journal of Electroanalytical Chemistry**. v. 149, p. 101-113, 1983.

GOLBA, S.; LOSKOT, J. The alphabet of nanostructured polypyrrole. **Materials**. v. 16, p. 1-39, 2023.

GONÇALVES, R.; PAIVA, R. S.; PEREIRA, E. C. Calculation of real growth current variable electroactive area obtained during polypyrrole synthesis. **Journal of Solid State Electrochemistry**. v. 25, p. 1567-1577, 2021.

GUO, X.; FACCHETTI, A. The Journey of conducting polymers from Discovery to application. **Nature Materials**. v. 19, p. 922-928, 2020.

GUPTA, V. et al. Production of recombinant pharmaceutical proteins. In: GUPTA, V. et al. **Basics and Applied Aspects of Biotechnology**. Singapura: Springer, 2017, p. 77-101.

GUTIÉRREZ, J. D. Effect of environmental variables on the incidence of visceral leishmaniasis in Brazil and Colombia. **Acta Tropica**. v. 252, p. 1-10, 2024.

HAN, R. et al. Antifouling electrochemical biosensor based on the designed functional peptide and the electrodeposited conducting polymer for CTC analysis in human blood. **Analytical Chemistry**. v. 94, p. 2204-2211, 2022.

HAZELTON, P.; YE, M.; CHEN, X. Introduction to conducting polymers. In: Zare, E. N.; MAKVANDI, P. (org.). **Electrically conducting polymers and their composites for tissue engineering**. EUA: ACS Publications, 2023, v. 1438, p. 1-7.

HEINE, V. et al. Electrochemical impedance spectroscopy biosensor enabling kinetic monitoring of fucosyltransferase activity. **ACS Sensors**. v. 6, p. 1003-1011, 2021.

HRYNIEWICZ, B. M. Polímeros condutores aplicados no desenvolvimento de biossensores para covid-19, no armazenamento de energia e na degradação eletrocatalítica de poluentes. Tese, Universidade Federal do Paraná, 2022.

HRYNIEWICZ, B. M. et al. Development of polypyrrole (nano)structures decorated with gold nanoparticles toward immunosensing for COVID-19 serological diagnosis. **Materials Today Chemistry**. v. 24, p. 1-11, 2022.

HRYNIEWICZ, B. M.; GIL, I. C.; VIDOTTI, M. Enhancement of polypyrrole nanotubes stability by gold nanoparticles for the construction of flexible solid-state supercapacitors. **Journal of Electroanalytical Chemistry**. v. 911, p. 1-6, 2002.

HULANICKI, A.; GLAB, S.; INGMAN, F. Chemical sensor definitions and classifications. **Pure and Applied Chemistry**. v. 63, p. 1247-1250, 1991.

IBARRA-MENESES, A. V. et al. New strategies and biomarkers for the control of visceral leishmaniasis. **Trends in Parasitology**. v. 36, p. 29-38, 2020.

IUPAC. **Compêndio de terminologia química**. Disponível em:

<<https://goldbook.iupac.org/terms/view/B00663>>. Acesso em: 07 jan. 2025.

JAIN, S. et al. Are nanobiosensors an improved solution for diagnosis of leishmania? **Pharmaceutics**. v. 13, p. 1-19, 2021.

JAMEIE, F. et al. Development of multi-epitope recombinant protein for the diagnosis of human visceral leishmaniasis. **Iranian Journal of Parasitology**. v.16, p. 1-10, 2021.

JALENDRA, G.; TAMTA, S.; KUMAR, P. S. Synergistic effects of gold nanoparticle surface morphology on catalysis and perovskite solar cell performance. **Inorganic Chemistry Communications**. v. 179, p. 114762, 2025.

KARNAWAL, A. et al. Gold nanoparticles in nanobiotechnology: From synthesis to Biosensing applications. **ACS Omega**. v. 9, p. 29966-29982, 2024.

KHAN, R. et al. Aptamer-based electrochemical biosensor with S protein binding affinity for COVID-19 detection: Integrating computational design with experimental validation of S protein binding affinity. **Sensors and Actuators B: Chemical**. v. 399, p. 1-8, 2024.

KIEBOOMS, R.; MENON, R.; LEE, K. **Handbook of advanced electronic and photonic materials and devices**. 1. ed. Londres: Academic Press, 2001, p. 1-86.

KIEFER, R. et al. Chemically polymerized polypyrrole on glucose-porcine skin gelatin nanofiber as multifunctional electrochemical actuator-sensor-capacitor. **Polymers**. v. 17, p. 1-18, 2025.

KIM, J.; JEONG, J.; KO, S. H. Electrochemical biosensors for point-of-care testing. **Bio-Design and Manufacturing**. v. 7, 4, p. 548-565, 2024.

KIM, E. R. et al. Biosensors for healthcare: Current and future perspectives. **Trends in Biotechnology**. v. 41, p. 374-395, 2023.

KISIEL, A. et al. Polypyrrole nanoparticles of high electroactivity. Simple synthesis methods and studies on electrochemical properties. **Electrochimica Acta**. v. 390, p. 1-9, 2021.

KUMAR, A. et al. A spotlight on the diagnostic methods of a fatal disease visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**. v. 42, p. 1-13, 2020.

KUMAR, N. et al. A label-free gold nanoparticles functionalized peptide dendrimer biosensor for visual detection of breakthrough infections in COVID-19 vaccinated patients. **Sensing and Bio-Sensing Research**. v. 47, p. 1-11, 2025.

LAKNER, P. H. et al. Probing the electrolyte transfer in ultrathin polypyrrole films by in situ x-ray reflectivity and electrochemistry. **Langmuir**. v. 36, p. 13448-13456, 2020.

LANZALACO, S.; MOLINA, B. G. Polymers and plastics modified electrodes for biosensors: A review. **Molecules**. v. 25, p. 1-37, 2020.

LARIOS, G. et al. A new strategy for canine visceral leishmaniasis diagnosis based on FTIR spectroscopy and machine learning. **Journal of Biophotonics**. v. 14, p. 1-9, 2021.

LASIA, A. The origin of the constant phase element. **The Journal of Physical Chemistry**. v. 13, p. 580-589, 2022.

LAZANAS, A. Ch.; PRODRONIDIS, M. I. Electrochemical impedance spectroscopy – A tutorial. **ACS Measurement Science Au**. v. 3, p. 162-193, 2023.

LEE, J. S. et al. Graphene oxide-based molecular diagnostic biosensor for simultaneous detection of Zika and dengue viruses. **2D Materials**. v. 7, p. 1-12, 2020.

LESTARI, C. S. W.; NOVIENTRI, G. Advantages of yeast-based recombinant protein technology as vaccine products against infectious diseases. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. v. 913, p. 1-8, 2021.

LÉVÊQUE, M. F. et al. Place of serology in the diagnosis of zoonotic leishmaniasis with a focus on visceral leishmaniasis due to *Leishmania infantum*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 10, p. 1-10, 2020.

LEY, B. et al. Repeatability and reproducibility of handheld quantitative G6PD diagnostic. **Neglected Tropical Diseases**. v. 16, p. 1-17, 2022.

LI, C. H. et al. Gold nanoparticles as a biosensor for cancer biomarker determination. **Molecules**. v. 28, p. 1-22, 2023.

LIBERATO, M. S. et al. Peptide-based assemblies on electrospun polyamide-6/chitosan nanofibers for detecting visceral leishmaniasis antibodies. **ACS Applied Electronic Materials**. v. 1, p. 2086-2095, 2019.

LIMA, D. et al. Electrochemical sensing of trypanosome- and flavivirus-related neglected tropical diseases. **Current Opinion in Electrochemistry**. v. 30, p. 1-11, 2021.

LIU, S. et al. Unleashing the potential electroactive hybrid biomaterials and self-powered systems for bone therapeutics. **Nano-Micro Letters**. v. 17, p. 1-35, 2025.

LOGUERCIO, L. F. et al. In-situ electropolymerization of congo red-doped polypyrrole and gold nanoparticle nanocomposite and its electrocatalytic application. **Electrochimica Acta**. v. 468, p. 1-8, 2023.

LOO, S. W.; PUI, T. S. Cytokine and cancer biomarkers detection: The dawn of electrochemical paper-based biosensor. **Sensors**. v. 20, p. 1-19, 2020.

MAGALHÃES, A. R. et al. Neglected tropical diseases risk correlates with poverty and early ecosystem destruction. **Infectious Diseases of Poverty**. v. 12, 32, p. 1-15, 2023.

MAGAR, H. S.; HASSAN, R. Y. A.; MULCHANDANI, A. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS): Principles, construction, and biosensing applications. **Sensors**. v. 21, p. 1-21, 2021.

MAHMOOD, J. et al. Preparation and characterization of hybrid polypyrrole nanoparticles as a conducting polymer with controllable size. **Scientific Reports**. v. 14, p. 1-12, 2024.

MAIA, C. et al. The estimated distribution of autochthonous leishmaniasis by *Leishmania infantum* in Europe in 2005-2020. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v. 17, p. 1-25, 2023.

MALECELA, M. N.; DUCKER, C. A road map for neglected tropical diseases 2021-2030. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 115, p. 121-123, 2021.

MARTINS, B. R. et al. Development of an electrochemical immunosensor for specific detection of visceral leishmaniasis using gold-modified screen-printing carbon electrodes. **Biosensors**. v. 10, p. 1-15, 2020.

MARTINS, B. R. et al. A comparative study of graphene-based electrodes for electrochemical detection of visceral leishmaniasis in symptomatic and asymptomatic patients. **Talanta Open**. v. 10, p. 1-11, 2024.

MARTINS, N. C. T. et al. Electrodeposition and characterization of polypyrrole films on aluminium alloy 6061-T6. **Electrochimica Acta**. v. 53, p. 4754-4763, 2008.

MARZOCHI, M. C. A. et al. Visceral leishmaniasis in Brazil: Scenarios and challenges for the surveillance and control. **Journal of Tropical Pathology**. v. 52, p. 1-10, 2023.

MCNEILL, R. et al. Electronic conduction in polymers. I. The chemical structure of polypyrrole. **Australian Journal of Chemistry**. v. 16, p. 1056-1075, 1963.

MCNEIL, R. et al. Electronic conduction in polymers. IV. Polymers from imidazole and pyridine. **Australian Journal of Chemistry**. v. 18, p. 477-486, 1965.

MENG, L. et al. Electrochemical biosensor based on dual-ligand functionalized lanthanide-encapsulated polyoxometalate conductive polymer film for detecting broad-spectrum tumor marker microRNA-155. **Inorganic Chemistry**. v. 63, p. 22149-22161, 2024.

MIHALCA, A. D. et al. A historical review on vector distribution and epidemiology of human and animal leishmanioses in Eastern Europe. **Research in Veterinary Science**. v. 123, p. 185-191, 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Painel epidemiológico**. Disponível em: <www.saude.gov.br>. Acesso em: 26 dez. 2024a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim epidemiológico: Estrutura e atividades das unidades de Vigilância de Zoonoses no Brasil, 2022**. Disponível em:

<<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2023/boletim-epidemiologico-volume-54-no-04>>. Acesso em: 27 dez. 2024b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico de Doenças Tropicais Negligenciadas**. Disponível em:

<<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2024/boletim-epidemiologico-de-doencas-tropicais-negligenciadas-numero-especial-jan-2024/view>>. Acesso em: 05 jan. 2025c.

MITRA, A. K.; MAWSON, A. R. Neglected tropical diseases: Epidemiology and global burden. **Tropical Medicine and Infectious Disease**. v. 2, p. 1-15, 2017.

MORÁKOVÁ, Z. et al. The evolution of the molecular structure of polypyrrole during chemical polymerization. **Synthetic Metals**. v. 271, p. 1-6, 2021.

MUKHERJEE, S. et al. 2D graphene-based advanced nanoarchitectonics for electrochemical biosensors: Application in cancer biomarker detection. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 250, p. 1-19, 2024.

NAMSHEER, K.; ROUT, C. S. Conducting polymers: A comprehensive review on recente advances in synthesis, Properties and applications. **RSC Advances**. v. 11, p. 5659-5697, 2021.

NAZARI-VANANI, R.; HELI, H.; SATTARAHMADY, N. An impedimetric genosensor for leishmania infantum based on electrodeposited cadmium sulfide nanosheets. **Talanta**. v. 217, p. 1-9, 2020.

NOYA, O. et al. Synthetic peptides as a strategy for the development of diagnostic systems to face new virus pandemics. Em: PUJOL, F. H.; PANIZ-MONDOLFI, A. E. **Emerging Viruses in Latin America**. v. 1, p. 239-253, 2024.

O'FLAHERTY, R. et al. Mammalian cell culture for production of recombinant proteins: A review of the critical steps in their biomanufacturing. **Biotechnology Advances**. v. 43, p. 1-17, 2020.

OGUNMOLASUYI, A. M.; ADEWOYIN, M. A. Microfluidic device: A versatile biosensor platform to multiplex aptamer-based detection of malaria biomarkers. **Cell Biochemistry & Function**. v. 42, p. 1-14, 2024.

OLIVEIRA, D. R.; ZARBIN, A. J. F.; SOUTO, D. E. P. Exploring the versatility of dendrimer-stabilized silver nanoparticles platforms: synthesis, characterization, and protein immobilization for enhanced biosensing applications. **New Journal of Chemistry**. v. 48, p. 17000-17012, 2024.

ORAZEM, M. E.; ULGUT, B. On the proper use of a Warburg impedance. **Journal of The Electrochemical Society**. v. 171, p. 1-7, 2024.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Observatório global de saúde**. Disponível em:

<<https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/number-of-cases-of-visceral-leishmaniasis-reported>>. Acesso em: 20 dez. 2024.

OTERO, T. F.; ARIZA, M. J. Revisiting the electrochemical and polymeric behavior of a polypyrrole free-standing electrode in aqueous solution. **The Journal of Physical Chemistry B**. v. 107, p. 13954-13961, 2003.

OUYANG, J. Application of intrinsically conducting polymers in flexible electronics. **SmartMat**. v. 2, p. 264-285, 2021.

OUYANG, Y. C. et al. Progress and prospects of chiral nanomaterials for biosensing platforms. **Rare Metals**. v. 43, p. 2469-2497, 2024.

ÖZBILGIN, A. et al. Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania tropica*. **Acta Parasitologica**. v. 68, p. 699-704, 2023.

PAN, J. et al. Research progress in stable interfacial constructions between composite polymer electrolytes and electrodes. **Energy Environment Sciences**. v. 15, p. 2753-2775, 2022.

93. PANCHAL, K. et al. Review on electrochemical impedance spectroscopy: A technique applied to hollow structured materials for supercapacitor and sensing applications. **Applied Spectroscopy Reviews**. v. 60, p. 30-55, 2025.

PANDEY, S.; MALVIYA, G.; DVORAKOVA, M. C. Role peptides in diagnostics. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 22, p. 1-22, 2021.

PANDIT, V. K. et al. Galvanostatically deposited polypyrrole thin films for supercapacitor applications: Effect of surfactant. **Materials Today: Proceedings**. v. 23, p. 246-259, 2020.

PANG, A. L. et al. Synthesis and factor affecting on the conductivity of polypyrrole: A short review. **Polymers for Advanced Technologies**. v. 32, p. 1428-1454, 2021.

PAUL, A.; SINGH, S. Visceral leishmaniasis in the COVID-19 pandemic era. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 117, p. 67-71, 2023.

PEREIRA, I. E. et al. Performance of recombinant proteins in diagnosis and differentiation of canine visceral leishmaniasis infected and vaccinated dogs. **European Journal of Microbiology and Immunology**. v. 10, p. 165-171, 2020.

PESQUEIRA, C. et al. Interfacial characterization of polypyrrole/AuNP composites towards eletrocatalysis of ascorbic acid oxidation. **Molecules**. v. 27, p. 1-11, 2022.

POOJA, A. K.; PRASHER, P.; MUDILA, H. Factors affecting the electrical conductivity of conducting polymers. **Carbon Letters**. v. 33, p. 307-324, 2022.

PRADANAS-GONZÁLEZ. F. et al. Biosensing strategies using recombinant luminescent proteins and their use for food and environmental analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v. 416, p. 7205-7224, 2024.

PRODROMIDIS, M. I. Impedimetric immunosensors – A review. **Electrochimica Acta**. v. 55, p. 4227-4233, 2010.

PUERRES, J.; ORTIZ, P.; CORTÉS, M. Effect of electrosynthesis potential on nucleation, growth, adhesion, and electronic properties of polypyrrole thin films on fluorine-doped tin oxide (FTO). **Polymers**. v. 13, p. 1-16, 2021.

KHAN, M. M. R.; RUMON, M. H. Recent progress of the synthesis, morphological topography, and battery applications of polypyrrole-based nanocomposites. **Polymers**. v. 16, p. 1-26, 2024.

REIMÃO, J. Q. et al. Laboratory diagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis: Current and future methods. **Microorganisms**. v. 8, p. 1-30, 2020.

REIS, C. P. S. Processos capacitivos em polianilina analisados pelo método de elemento de fase generalizado. Dissertação, Universidade Federal de Santa Catarina, 2017.

RIBEIRO, A. I.; DIAS, A. M.; ZILLE, A. Synergistic effects between metal nanoparticles and commercial antimicrobial agents: A review. **ACS Applied Nano Materials**. V.5, p. 3030-3064, 2022.

ROBINSON, C.; JUSKA, V. B.; O'RIORDAN, A. Surface chemistry applications and development of immunosensor using electrochemical impedance spectroscopy: A comprehensive review. **Environmental Research**. v. 237, p. 1-17. 2023.

RONG, G. et al. A high-throughput fully automatic biosensing platform for efficient COVID-19 detection. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 220, p. 1-9, 2023.

SAHA, K. et al. Gold nanoparticles in chemical and biological sensing. **Chemical Reviews**, v. 112, p. 2739-2779, 2012.

SAPNA, K. et al. Diagnosis of neglected tropical zoonotic disease, leptospirosis in a clinal sample using photothermal immunosensor. **Analytical Chemistry**. v. 93, p. 409-418, 2023.

SCOTT, J. C. **Nanostructured conductive polymers**. 1. ed. Nova Iorque: John Wiley & Sons, 2010, p. 3-17.

SHARMA, S. et al. Recent trends and developments in conducting polymer nanocomposites for multifunctional applications. **Polymers**. v. 13, p. 1-31, 2021.

SIQUEIRA, W. F. et al. The increased presence of repetitive motifs in the KDDR-plus recombinant protein, a kinesin-derived antigen from *Leishmania infantum*, improves

the diagnostic performance of serological tests for human and canine visceral leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v. 15, p. 1-20, 2021.

SIQUEIRA, W. R. Identification of new antigens for the diagnosis of the visceral leishmaniasis. Tese, Maastricht University, 2023.

SOARES, A. L. Estudos eletroquímicos e espectroscópicos da adsorção de micropoluentes em nanocompósitos PEDOT-AuNPs. Tese, Universidade Federal do Paraná, 2019.

SOARES, A. L. et al. Adsorption of catechol onto PEDOT films with gold nanoparticles: electrochemical and spectroscopic studies. **Electrochimica Acta**. v. 322, p. 1-9, 2019.

SOUTO, D. E. P. et al. Development of a label-free immunosensor based on surface plasmon resonance technique for the detection of anti-*Leishmania infantum* antibodies in canine serum. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 46, p. 22-29, 2013.

SOUTO, D. E. P. et al. SPR analysis of the interaction between a recombinant protein of unknown function in *Leishmania infantum* immobilized on dendrimers and antibodies of the visceral leishmaniasis: a potential use in immunodiagnosis. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 70, p. 275-281, 2015.

SOUTO, D. E. P. Estudo da imobilização de antígenos de *leishmania infantum* sobre plataformas organizadas empregando SPR e QCM para detecção de anticorpos específicos da leishmaniose visceral. Tese, Universidade Estadual de Campinas, 2016.

STRADIOTTO, R. et al. Electrochemical sensors: A powerful tool in analytical chemistry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v.14, p. 159-173, 2003.

STUKOVNIK, Z.; FUCHS-GODEC, R.; BREN, U. Nanomaterials and their recent applications in Impedimetric biosensig. **Biosensors**. v. 13, p. 1-21, 2023.

SUN, M. et al. An ultrasensitive flexible biosensor enabled by high-performance graphene field-effect transistors with defect-free van der Waals contacts for breast cancer miRNA fast detection. **Talanta**. v. 287, p. 1-9, 2025.

SHOJAEI, S.; ROSTAMI-TAPEH-ESMAEIL, E.; MIGHRI, F. A review on key factors influencing the electrical conductivity of proton exchange membrane fuel cell composite bipolar plates. **Polymers Advanced Technologies**. v. 35, p. 1-17, 2023.

THÉVENOT, D. R. et al. Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification (Technical report). **Pure and Applied Chemistry**. v. 71, p. 2333-2348, 1999.

TOOR, J. et al. Predicted impact of COVID-19 on neglected tropical disease programs and the opportunity for innovation. **Clinical Infectious Diseases**. v. 72, p. 1463-1466, 2021.

TRAN, V. V. et al. Development strategies of conducting polymer-based electrochemical biosensors for virus biomarkers: potential for rapid COVID-19 detection. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 182, p. 1-22, 2021.

ULLAH, S. F. et al. An experimental framework for developing point-of-need biosensors: Connecting bio-layer interferometry and electrochemical impedance spectroscopy. **Biosensors**. v. 12, p. 1-23, 2022.

VAIDYA, A.; SAHOO, J.; SHENDE, P. Molecularly imprinted polymer-based biosensor for detection of salivary glucose in diabetes. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 671, p. 1-11, 2025.

VIEIRA, T. A. Doenças negligenciadas: uma revisão sobre as principais infecções em populações de baixa renda, seus avanços e desafios. **Brazilian Journal of Development**. v. 9, 5, p. 16958-16978, 2023.

VOLPE, J. et al. Synthetic peptides-based SPR biosensor evaluation towards canine visceral leishmaniasis diagnosis: A simple and effective approach. **Microchemical Journal**. v. 203, p. 1-10, 2024.

WALTER, J.-G.; et al. SPR biosensor based in polymer multi-mode optical waveguide and nanoparticle signal enhancement. **Sensors**. v. 20, p. 1-11, 2020.

WAMAI, R. G. et al. Visceral leishmaniasis: A global overview. **Journal of Global Health Science**. v. 2, p. 1-22, 2020.

WASILEWSKI, T.; KAMYSZ, W.; GEBICKI, J. AI-assisted detection of biomarkers by sensors and biosensors for early diagnosis and monitoring. **Biosensors**. v. 14, p. 1-37, 2024.

YUNUS, G. et al. Electrochemical biosensors in healthcare services: Bibliometric analysis and recent developments. **PeerJ**. v. 11, p. 1-27, 2023.

ZENG, J. et al. An impedimetric biosensor for COVID-19 serology test and modification of sensor performance via dielectrophoresis force. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 213, p. 1-10, 2022.

ZHANG, J. et al. Synthesis of polypyrrole film by pulse galvanostatic method and its application as supercapacitor electrode materials. **Journal of Materials Science**. v. 45, p. 1947-1954, 2010.

ZHANG, L. et al. Antibody-gold nanoparticles bioconjugates for biosensors: Synthesis, characterization and selected applications. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 165, p. 1-16, 2022.

ZHANG, L. et al. Electrochemical biosensors represent promising detection tools in medical field. **Advanced Sensor and Energy Materials**. v. 2, 2, p. 1-16, 2023.

ZHANG, Y.; ZHOU, N. Electrochemical biosensors based on micro-fabricated devices for Point-of-Care Testing: A review. **Electroanalysis**. v. 34, p. 168-183, 2022.

ZHANG, Z. X. et al. Strategies for efficient production of recombinant proteins in *Escherichia coli*: alleviating the host burden and enhancing protein activity. **Microbial Cell Factories**. v. 21, p. 1-18, 2021.